

VERIFICATION OF TRANSLATION

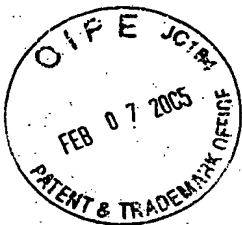
I, Seiya FUJINO, residing at 5-3, Ozuki, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa
247-0027 Japan

hereby certify that to the best of my knowledge and belief, the attached document
is a true translation into English made by me of International Application No.
PCT/JP99/05423 filed on October 1, 1999.

Seiya Fujino
(Seiya FUJINO)

27 January, 2005
Date

BEST AVAILABLE COPY



DESCRIPTION

ESTABLISHED CELLS

TECHNICAL FIELD

5 The present invention relates to immortalized cells established from a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced.

10 More specifically, the present invention relates to established cells derived from retinal capillary endothelial cells of the transgenic animal.

15 The established cells derived from retinal capillary endothelial cells of the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and outside polarity when culturing in a culture dish. Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs to the retina by the assessment of chemical uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal
20 parenchyma, studying the transport mechanism of permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicity of chemicals on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition, a blood retinal barrier can be reconstructed in the test tube (in vitro)
25 by coculture with Mueller cells which are a kind of glia cells. The cell lines of the present invention are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof,

and developing methods for diagnosing and treating diseases relating to intraocular homeostatic maintenance and functional disorders of retinal tissues on cellular level studies.

5 The present invention also relates to established cells derived from choroid plexus epithelial cells of the transgenic animal.

The established cells derived from choroid plexus epithelial cells of the present invention are useful for studying nutrition metabolism in the brain, studying permeation of drugs
10 into the brain, and investigating the protection mechanism of metabolism and permeation of substances into the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing methods for diagnosing and treating diseases relating to
15 nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain on cellular level studies.

Furthermore, the present invention relates to established cells derived from brain capillary endothelial cells of the transgenic animal.

20 The established cells derived from brain capillary endothelial cells of the present invention are useful for studying the blood-brain barrier which restricts moves of substances from blood to brain tissues. Specifically, these cells are useful for the study of nutrition metabolism in the
25 brain, the study of permeation of chemicals into the brain, and the study of the protection mechanism of metabolism and permeation of substances into the cerebrospinal system. These

cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain on cellular level studies.

BACKGROUND ART

Conventionally, tests for the assessment of safety and efficacy of drugs have been conducted using animals. However, to avoid use of a large number of animals from the viewpoint of animal right, technologies for in-vitro assessment of safety and efficacy of drugs using cultured cells are used on a practical level. For example, a technique of first testing using primary culture cells collected from living tissues or established immortalized cells which can infinitely proliferate, and then testing using animals is employed. The primary culture cells can initially proliferate very well, but the proliferation gradually declines as the subculture advances, and finally cells die out. This phenomenon is called cellular senescence.

Furthermore, in addition to the fear that the characteristics of primary culture cells may differ each time they are collected from living tissues, the primary culture cells are said to change the characteristics as the subculture advances. Particularly, when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organ, it is very difficult to obtain a sufficient amount of the primary culture cells for test. On the other hand, established culture cell which have acquired the capability of infinitely proliferating during subcultures of

the primary culture cells can maintain stable characteristics. However, most of these cells no longer have part or all of the forms and functions possessed by the cells when they were in a living body. Therefore, it is difficult for such established
5 cells to precisely reflect the original characteristics which the cell lines exhibited in the tissues from which they have been derived. In view of this situation, establishment of immortalized cells which can continuously maintain an active proliferation capability possessed by the primary culture cells
10 without losing the characteristics inherently possessed by the cells during subculture, has been tried by transforming the cells by introducing oncogenes such as ras and c-myc, E1A gene of adenovirus, large T-antigen gene of SV40 virus, or HPV16 gene of human papillomavirus. Such immortalized cells which are
15 derived, from some organs lose several functions at the time of introducing oncogenes or large T-antigen genes after preparation of a primary culture cell. Thus, acquisition of immortalized cells in the stringent meaning of holding an original function has been difficult. Preparing a primary
20 culture cell and acquiring a cell line has been very difficult, particularly when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organization.

To overcome these problems, a method of establishing immortalized cells by applying a recently developed transgenic
25 technology to individual animals has been proposed. Instead of introducing oncogenes or large T-antigen genes into individual cells, according to this method, transgenic animals into which

these genes have been introduced in chromosomes in a stable manner are prepared. Then, a primary culture cell is prepared from an organ of these animals which possesses the oncogenes or large T-antigen genes in the cells at the time of development of the individuals. The primary culture cells is subcultured to establish immortalized cells. In particular, immortalized cells are easily available from organs of transgenic mice into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced. The immortalized cells are very useful because growth of the resulting cells and expression of the differentiation character can be managed by changing the temperature (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244. Rats having a body weight about ten times that of mice are advantageous for preparing cells used for the establishment of a cell line from various organs, particularly for preparing a cell line originating from small organs such as retinal capillary endothelial cells or intracerebral cells (e.g. choroid plexus epithelial cells, capillary vessel endothelial cells, etc.), because primary culture cells or many other cells can be easily obtained by separating organs or tissues from the rats. Therefore, transgenic rats into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced, which are useful for establishing immortalized cells due to easy availability from various organs and the capability of controlling the growth of the resulting cells and expression of the differentiation character by changing temperatures, had

already been produced.

On the other hand, a method of using a primary culture cell of retinal capillary endothelium in place of animal tests is being developed in view of animal right. In this instance, because it is difficult to obtain a sufficient amount of primary culture cells which can be for test from small animals, the eyeballs of large animals such as cattle must be used. However, the number of cells obtained by isolating retinal capillary endothelial cells from twenty eyeballs of cattle and subculturing the cells for two generations is at most 9×10^6 or so (Wong H. C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol, Visual, Sci., 28, 1767-1775). Thus, a great number of eyeballs of cattle is required for screening drugs. Therefore, an effective retinal capillary endothelial cell stock which can be used in place of the cells from the eyeballs of cattle has been desired.

For the same reason, in research investigating the effect and mechanism of nerve drugs on the blood-cerebrospinal fluid barrier mechanism, a method of using a primary culture cell of choroid plexus epithelial cells in place of animal tests is being developed in view of animal right. In this instance, because it is difficult to constantly obtain a sufficient amount of culture cells for the test from small animals, effective cell lines usable in place of such culture cells have been strongly desired.

Furthermore, in toxicology research investigating the effect and mechanism of drug transfer into the brain on the blood-brain barrier mechanism, a method of using a primary culture

cell of cerebrovascular endothelial cells in place of animal tests is being developed in view of animal right. In this instance, because it is difficult to constantly obtain a sufficient of culture cells for the test, valuable cell lines usable in place of such culture cell have been strongly desired.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

In view of this situation, the present inventors have conducted extensive studies and, as a result, have established immortalized cells from transgenic rats into which immortalizing genes have been introduced by separating retinal capillary vessels from the retinal tissue of the rats and isolating retinal capillary endothelial cells from the resulting capillary vessels.

An object of the present invention is therefore to obtain established cells derived from retinal capillary endothelial cells and capable of expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transport carrier, and p-glycoprotein.

Another object of the present invention is to provide a method of establishing immortalized cells using a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58.

In addition, the present inventors have established immortalized cells from transgenic rats into which immortalizing genes have been introduced by separating an epithelial cell line from the choroid plexus of brain.

Still another object of the present invention is therefore to provide established cells derived from choroid plexus epithelial cells, capable of expressing a temperature sensitive

SV40 large T-antigen gene, showing localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transport carriers in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, showing the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the apical side.

5 A further object of the present invention is to provide a method of establishing such immortalized cells using a large T-antigen gene of the SV40 temperature sensitive mutant tsA58.

Still further, the present inventors have established immortalized cells from transgenic rats into which immortalizing
10 genes have been introduced by separating brain capillary vessels from the brain of the rats and isolating brain capillary endothelial cells from the resulting capillary vessels.

A further object of the present invention is therefore to obtain established cells derived from brain capillary
15 endothelial cells and capable of expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transport carrier, p-glycoprotein, alkaline phosphatase, and γ -glutamyltransferase.

A still further object of the present invention is to
20 provide a method of establishing immortalized cells using a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58.

The present invention has been completed to achieve the above objects and relates to immortalized cells established from a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40
25 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced. More specifically, the present invention relates to the established cells derived from retinal capillary endothelial cells of such

transgenic animals. In particular, the present invention relates to established cells which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transport carrier, and p-glycoprotein. Cell deposited in National Institute of
5 Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries, under the deposition number FERMBP-6507 can be given as such established cells.

Furthermore, the present invention relates to a method
10 of establishing immortalized cells comprising homogenizing the retinal tissue of such a transgenic animal, separating capillary vessels, treating the resulting retinal capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells. The rat can be given as an example of such a transgenic animal.

15 Furthermore, the present invention relates to the established cell obtained using such a method of establishment.

Such established cells of the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and-outside polarity when culturing in culture dish.

20 Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs into the retina by the assessment of drug uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal parenchyma, studying the transport mechanism of
25 permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicity of drugs on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition,

a blood retinal barrier can be reconstructed in a test tube (in vitro) by coculturing with Mueller cells which are a kind of gliacells. The cell lines of the present invention are therefore useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to intraocular homeostatic maintenance and functional disorders of retinal tissues through cellular level studies.

The present invention also relates to established cells derived from choroid plexus epithelial cells of such a transgenic animal. Specifically, the present invention relates to established cells expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, showing localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transport carriers in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, showing the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the apical side. The cells deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries, under the deposition number FERMBP-6508 can be given as such established cells.

The present invention also relates to a method of establishing immortalized cells comprising treating the choroidal plexus tissues of such a transgenic animal with protease, selecting the cells exhibiting an epithelial cell-like/paving stone-like form from the resulting cells, and subculturing such cells. The rat can be given as an example of such a transgenic animal.

Furthermore, the present invention relates to the

established cells obtained using such a method of establishment.

Due to the capability of forming tight junction among cells when cultured in a mono-layer on a porous flat membrane and the capability of reconstructing the blood-cerebrospinal fluid barrier with a inside-and-outside polarity in vitro, the established cells are useful for studying nutrition metabolism of the brain, studying permeation of drugs into the brain, and investigating the protection mechanism of metabolism and permeation of substances into the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain on cellular level studies.

Furthermore, the present invention relates to established cells derived from brain capillary endothelial cells of such a transgenic animal. Specifically, the present invention relates to established cells which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, maintain an alkaline phosphatase activity and γ -glutamyltransferase activity, and express a scavenger receptor, GLUT-1 transporter and p-glycoprotein. The cell line deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries, under the deposition number FERMBP-6873 can be given as such an established cell.

The present invention also relates to a method of

establishing immortalized cells comprising separating brain capillary vessels from the brain tissues of such a transgenic animal, treating the brain capillary vessels with protease, selecting the cells exhibiting a spindle fiber-like form specific to endothelial cells from the resulting cells, and subculturing such cells. The rat can be given as an example of such a transgenic animal.

Furthermore, the present invention relates to the established cells obtained using such a method of establishment.

Due to the capability of mutually bonding and reconstructing the blood-brain barrier with a inside-and-outside polarity in vitro when cultured in a mono-layer on a porous flat membrane, the established cells are useful for studying the blood-brain barrier which restricts movement of substances to the brain tissues from blood, specifically, studying the nutrition metabolism in the brain and permeation of drugs into the brain, and investigating the protection mechanism in the blood-brain barrier. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain through cellular level studies.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a substrate concentration dependency of a 3-OMG uptake speed of the established cell (TR-iBBB2) obtained in Example 5 of the present invention.

Figure 2 shows confocal laser scanning microscopy of Na^+ - K^+ ATPase of the established cell (TR-CSFB3) obtained in Example 10 of the present invention.

The upper photograph is a microscopic photograph of a plan view (XY section) of the cell wherein Na^+ - K^+ ATPase and GLUT-1 are seen to be expressed. The lower photograph is a microscopic photograph of a cross section view (XZ section) of the cell wherein Na^+ - K^+ ATPase are seen localized in apical side.

Figure 3 shows the proline active transport capability of the established cell (TR-CSFB3) obtained in Example 11 of the present invention.

Figure 4 shows interference of the proline active transport capability of the established cell (TR-CSFB3) obtained in Example 12 of the present invention by choline and ouabain.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The transgenic rat used in the present invention into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced can be obtained as follows.

Specifically, a whole genome DNA of tsA58ori(-)-2 which is produced from a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40, for example, with deletion of the SV40 ori (replication origin), is linearized using a restriction endonuclease BamHI, and introduced into pBR322 to obtain a plasmid pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) pBR322. The plasmid is amplified in Escherichia coli in a large amount according to a conventional method.

The plasmid thus obtained is cut with a restriction endonuclease BamHI to eliminate a vector region. Because the DNA (5,240bp) having a large T-antigen gene of tsA58 thus obtained has a promoter of the large T-antigen gene therein, a rat into which the DNA is introduced expresses this gene (the large T-antigen gene of tsA58) in all somatic cells.

Next, the resulting DNA is introduced into totipotent cells of rats in accordance with a conventional method to prepare transgenic rats having a temperature sensitive large T-antigen gene in all cells. As a totipotent cell, ES cells having totipotency can be given in addition to fertilized ova and early embryos. A microinjection method, electroporation method, liposome method, calcium phosphate method, and the like can be used for introducing DNA into ova and cultured cells.

Furthermore, the present gene can be introduced into ova by transplanting a nucleus of cultured cells into which a desired gene of the present invention has been introduced in enucleation unfertilized ova and initializing the ova (nuclear transplantation). However, as far as the efficiency of obtaining a transgenic rat is concerned, a transgenic rat having a large T-antigen gene of tsA58 incorporated into chromosomes of cells of each tissue at the time of development of individuals can be efficiently obtained by producing ova through microinjection of the gene of the present invention into male pronucleus of the pronucleus ova, transplanting the ova into the oviduct of a foster mother to obtain offspring, and selecting the offspring having the injected gene, thereby stably obtaining

individuals into which the gene of the present invention has been incorporated.

Immortalized cells can be prepared with extracting cells (primary cells) from organs of gene-introduced rats thus obtained and repeating subculture of the cells. The resulting cells obtain the characters that the cells have the capability of permanently proliferating at 33-37°C and show the proper characteristics with terminating the proliferation at 39°C.

The retina is prepared from the eyeballs of this rat and cut into small pieces. The tissues are homogenized by using a taper-type homogenizer made of Teflon and the resulting slurry was centrifuged to obtain pellets. The resulting pellets are suspended in an enzyme (protease) solution and treated with the enzyme while shaking, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. Pellets are obtained by centrifugation. The pellets thus obtained are suspended in a Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 25% bovine serum albumin to remove unnecessary tissues. Capillary vessel pellets are recovered by centrifugation. After enzyme treatment of the pellets by suspending again in the enzyme solution, the capillary vessels cut into fine pieces are inoculated in a culture dish. After subculturing two generations, colonies are formed. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate are isolated from surrounding cells using a penicillin cup. This procedure are repeated twice to isolate the cells of the present invention. Expression of a large T-antigen of tsA58, GLUT-1 transporter and p-glycoprotein are confirmed by the Western Blotting method,

whereby the cells are identified to be the immortalized retinal capillary endothelial cells. The cells thus obtained exhibit excellent growth after 50 generation subculture at 33°C and possess functions of retinal capillary endothelial cells.

5 Moreover, the brain of this rat is taken out to collect choroid plexus. The choroid plexus cut into pieces is treated with trypsin/EDTA to disperse cells. After terminating the enzymatic reaction by the addition of a culture medium containing fetal serum, the cells are collected by centrifugation and
10 dispersed in a culture medium. The procedures of centrifugation and dispersion are repeated to wash the cells. The cells thus obtained are dispersed in a culture medium, inoculated on a culture plate, and incubated at 33°C. After subculturing three generations, colonies are formed. Colonies exhibiting a paving
15 stone-like form inherent to epithelial cell and a comparatively fast growth rate are isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. This procedure is repeated twice to isolate the cells originating from a single cell. The cells obtained are subjected to immunostaining to confirm localization of Na⁺
20 -K⁺ ATPase and GLUT-1 transporter on the cell membrane using a confocal laser scanning microscopy, whereby the cells are identified. The resulting cells exhibit a large T-antigen, maintain excellent proliferating activity after 50 generation subculture at 33°C, and express Na⁺ -K⁺ ATPase and GLUT-1
25 transporter. In particular, when the cells are cultured in a monolayer, Na⁺ -K⁺ ATPase which is present on the basolateral membrane side (a serous membrane) in other epithelial cells,

is locally present in the apical side of the cell membrane.

In the same manner, the brain of this rat is taken out to collect cerebrum. The cerebrum cut into small pieces is homogenized using a taper-type homogenizer made of Teflon and the resulting slurry is centrifuged using 16% dextran to obtain pellets (brain capillary fractions). The resulting brain capillary fractions are suspended in an enzyme

(collagenase/dispase) solution and treated with the enzyme while shaking, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. Pellets are obtained by centrifugation. The pellets thus obtained are suspended in a Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 16% dextran to remove unnecessary tissues. Capillary vessel pellets are recovered by centrifugation.

After enzyme treatment of the pellets again by suspending in the enzyme solution, the capillary vessels cut into pieces are inoculated in a culture dish. After culture at 33°C in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, saturated humidity), confluent cells are treated with trypsin to collect and disperse. Then, the cells are subcultured. After subculturing three generations, colonies are formed. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate are isolated from surrounding cells using a penicillin cup. This procedure is repeated twice to isolate the cells of the present invention. Expression of a large T-antigen of tsA58, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein in the isolated cells are confirmed by the Western Blotting method. In addition, uptake of Dil-fluorescence-labeled cells (AcLDL) is observed by a confocal laser scanning microscopy to confirm

expression of a scavenger receptor, and the alkaline phosphatase activity and γ -glutamyltrans peptidase activity are measured, whereby the cells are identified to be the brain capillary endothelial cells. The cells thus obtained exhibit excellent growth after 50 generation subculture at 33°C and possess functions of brain capillary endothelial cells.

EXAMPLES

The present invention will now be described in more detail by way of examples, which are given for the purpose of explanation and should not be construed as limiting the present invention.

Example 1

Preparation of transgenic rat

A transgenic rat carrying DNA of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was prepared according to the following method.

(1) Preparation of a gene to be introduced

DNA of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was used for microinjection. The genome DNA of tsA58 was linearized using a restriction endonuclease BamHI and introduced into the BamHI site of pBR322 to convert the Sfi I sequence to the SacII sequence, thereby obtaining a DNA clone pSVtsA58 ori(-)-2 with deletion of the SV40 ori site (replication origin) (See Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991), Figure 1). The DNA was prepared from the pSVtsA58 ori(-)-2 according to a conventional method. Specifically, the pSVtsA58 ori(-)-2 of plasmid DNA obtained by amplification in Escherichia coli. was digested using a restriction endonuclease BamHI (made by Takara Shuzo Co.,

Ltd.) and the vector region was separated by agarose gel electrophoresis (1% gel; Boeringer company). Linear DNA fragment of tsA58 DNA with a length of 5240 bp were cut out from the gel. The gel was dissolved by agarase treatment (0.6 unit/100 mg gel: Agarase; Boeringer Co.). DNA was recovered by phenol-chloroform treatment and ethanol precipitation treatment. The purified DNA was dissolved in a TE buffer (10 mM Tris-HCl containing 1 mM EDTA, pH 7.6) to obtain a purified DNA solution with a concentration of 170 µg/mL. The DNA solution was diluted with a buffer (10 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, pH 7.6) to a concentration of 5 µg/mL to obtain a DNA solution for microinjection. The resulting DNA solution was stored at -20°C until used for microinjection.

(2) Preparation of transgenic rat

Microinjection of the DNA solution prepared in (1) above to the rat ova at pronucleus stage was carried out according to the following procedures. Sexually mature Wistar rats, aged eight weeks, were kept in a condition of a 12 hour light-and-shade cycle (light hours: 4:00-16:00) at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and RH $55 \pm 5\%$. The estrous cycle of female rats was observed by vaginal smear to select the hormonal treating day. A pregnant-mare serum gonadotropic hormone (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG, manufactured by Nippon Zenyaka Co.) was intraperitoneally administered at a dose of 150 IU/kg to female rats. After 48 hours, 75 IU/kg of human chorionic gonadotropin (hCG manufactured by Sankyo Zoki Co.) was administered thereby effecting superovulation treatment. The female and male rats were mated

by being together in a cage. The ova at pronucleous stage were collected at 32 hours after the hCG administration by oviduct perfusion. AmKRB solution (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974)) was used for the oviduct perfusion and incubation of ova. The collected (fertilized) ova were treated by an enzyme in an mKRB solution containing 0.1% hyaluronidase (Hyaluronidase Type I-S, made by Sigma Co.) at 37°C for 5 minutes to remove cumulus cells. After washing three times with the mKRB solution to remove the enzyme, the fertilized ova were stored in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, 37°C, saturated humidity) until DNA microinjection. A DNA solution was microinjected into the male pronucleus of the rat (fertilized) ova thus prepared. 228 ova after microinjection were transplanted in nine recipients (foster mothers) and 80 pups were obtained. The integration of the DNA was analyzed with DNA prepared from tails of the rats immediately after weaning by the PCR method (primers used: tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (corresponds to 1365-1384 sites), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTTGGCACTTG-3' (corresponds to 1571-1590 sites)). As a result, 20 rats (6 male, 8 female, and 6 unknown sexuality) were identified to have the gene introduced. Among these rats, 11 transgenic rat lines (male lines: #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, female lines: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) which survived as long as 12 weeks after elapse of the sexual maturation period were obtained. These G0 generation transgenic rats were mated with Wistar rats and established 2 lines of male founders (#07-2, #07-5) and 3 lines

of female founders (#09-7, #11-6, #19-8), by confirming that the genes was introduced in germ line and transferred to next generation

Example 2

5 Isolation of retinal capillary endothelial cells

The method of Greenwood (Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132) was modified and applied to the isolation of retinal capillary endothelial cells from the retina. Eyeballs were collected from one transgenic rat carrying a large
10 T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 described in Example 1. The eyeballs were thoroughly washed with an ice-cooled buffer solution (HBSS containing 10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 0.5% bovine serum albumin) in a clean bench. The retinal
15 tissue was removed and cut into pieces with a volume of 1-2 mm³. The tissue pieces were placed in a 1 mL taper-type Teflon homogenizer (WHEATON Co.). 1 mL of ice-cooled buffer solution was added and the mixture was homogenized by four up-and-down strokes to obtain a slurry. The slurry was centrifuged (600
20 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. The pellets were suspended in a 1 mL of enzyme solution (HBSS containing 0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim) 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 µg/mL
25 tosyl-lysine-chloromethylketone) and digested by beeping in a water bath with shaking at 37°C for 30 minutes, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. The enzyme treated

slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets.

The pellets thus obtained were suspended in HBSS containing 25% bovine serum albumin to remove unnecessary tissues.

The pellets of capillary vessel fraction were recovered by

5 centrifugation (1,000 g, 15 minutes, 4°C). The pellets were suspended again in a 1 mL enzyme solution and treated at 37°C for 30 minutes to digest the capillary vessels into fine pieces.

The enzyme treated slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. Next, the pellets obtained were

10 dispersed in a 2 mL culture solution (DMEM containing 15 µg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 2.50 µg/mL

amphotericin B) and inoculated in a 35 mm ϕ culture dish coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The

15 cells were incubated (primary culture) at 33°C in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, saturated humidity). Subculture was carried

out at an interval of about one week using a trypsin solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) while replacing the medium twice a week. After subculturing twice,

20 10^2 - 10^3 cells were inoculated in a 100 mm ϕ culture dish coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The

cells were incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies.

After preparation of colonies for 7-10 days while replacing the medium twice a week, the colonies exhibiting a comparatively

25 fast growth rate were isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. The cells obtained were again inoculated in

a 100 mm ϕ culture dish and incubated at 33°C in a CO₂ incubator

to form colonies. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated using a penicillin cup to obtain five lines of cells (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9).

5 TR-iBRB2 was deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries. The deposition number is FERM BP-6507.

Example 3

10 Confirmation of large T-antigen proteins

Expression of large T-antigen proteins in the five cell lines obtained in Example 2 was examined by the Western Blotting method (Experimental Medicine Separate Volume, Biotechnology Manual UP Series, "Cancer research protocol by the molecular biological approach", pages 108-115, YODOSHA Publishing Co., 1995). The five cell lines (the 20th generation) were cultured in 90 mm ϕ culture dishes until saturation. The collected cells were solubilized using 3% SDS-PBS (pH 7.4) and unsolubilized fractions were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes, and then the total amount of proteins was determined by the Bradford method using the protein assay kit II of the BIO-RAD Co. The proteins were separated by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the amount of 20 μ g each and transferred onto nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes blocked by a 3% skimmed milk solution were reacted with an anti-SV40 large T-antigen mouse antibody (DP02-C, CALBIOCHEM Co.), as a primary antibody, and a HRP labeled

anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.), as a secondary antibody, to detect the reactions specific to large T-antigen proteins using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1, a product of Amersham Co.). The results are shown in Table 1.

5 In Table, "+" indicates that the reaction specific to a large T-antigen protein was detected. As a result, the expression of large T-antigen proteins was confirmed in all five cell lines.

Table 1

Cells	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T-Antigen	+	+	+	+	+

10 Example 4

Identification of cells

The cells obtained in Example 2 were identified to be retinal capillary endothelial cells by confirming the expression of a GLUT1 transporter and p-glycoprotein by the Western Blotting method. Using nitrocellulose membranes prepared in the same manner as in Example 3, the cells obtained were reacted with an anti-GLUT-1 mouse antibody (Temecular, CA, Chemicon Co.) or an anti-p-glycoprotein rabbit antibody (anti-mdr antibody, Oncogene Research Products Co.), as primary antibodies, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.) or a HRP labeled anti-rabbit IgG antibody (Cappel Co.), as secondary antibodies, to detect the reactions specific to GLUT-1 protein or p-glycoprotein using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1, Amersham Co.). The results are shown in Table 2.

25 In the Table, "+" means that the GLUT-1 protein or p-glycoprotein

were detected. As a result the GLUT-1 protein and p-glycoprotein were detected in all five cell lines. Therefore, the five cell lines obtained were detected to be retinal capillary endothelial cells.

5

Table 2

Cells	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
GLUT-1	+	+	+	+	+
P-Glycoprotein	+	+	+	+	+

Example 5

Confirmation of glucose transport capability

10 The 3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) uptake capability was determined using the cells TR-iBRB2 obtained in Example 2 to confirm that the cells exhibit concentration-dependent glucose transport capability, indicating the possession of a functional GLUT-1 transporter. Specifically, TR-iBRB cells were
15 inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of 3×10^5 cells /well/mL and incubated for 24 hours at 33°C in a CO₂ incubator to be the cells confluent. The 3-OMG uptake was determined according to the following procedure. After removing medium by aspiration, 0.2 mL of an uptake buffer
20 containing 232 kBq/mL of [³H]3-OMG heated to 37°C was added. The uptake buffer used in this Example did not contain glucose and was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, and 25 mM NaHCO₃ by bubbling 5% CO₂-95% O₂ into the solution

for 20 minutes and adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH (this is hereinafter designated as uptake buffer (1)). After 10 seconds, the uptake buffer (1) was removed and the residue was washed with the uptake buffer (1) at 4°C. The same procedure was repeated except for changing the period of time before removing the uptake buffer (1) to 20 seconds, 30 seconds, or one minutes. The cells were solubilized in 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 and the radioactivity was measured using a liquid scintillation counter to confirm the linearity of the 3-OMG uptake capability. As a result, an uptake time of 20 seconds was set.

Next, the substrate concentration dependency of the 3-OMG uptake capability was examined. After washing the cells with the uptake buffer (1) heated to 37°C, 0.2 mL of the uptake buffer (1) containing 462 kBq/well of [³H]3-OMG was added. Solutions containing 3-OMG at different concentrations were prepared by adding non-labeled 3-OMG to the uptake buffer (1) to make final concentrations of 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, and 50 mM. After 20 seconds, the uptake buffer (1) was removed and the residue was washed with the uptake buffer (1) containing 10 mM non-labeled 3-OMG at 4°C. Next, the cells were solubilized overnight in 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 and the radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. The results are shown in Figure 1. Using the plot formula for the uptake rate vs. the 3-OMG concentration ($V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$), wherein V_{max} indicates a maximum velocity constant, K_m indicates the Michaelis constant, and $[s]$ is a substrate

concentration), the K_m and the V_{max} for 3-OMG uptake were analyzed using the non-linear minimum square program (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885). As a result, it was confirmed that the uptake of [3H]3-OMG which is the substrate of the GLUT-1 was concentration-dependent, the Michaelis constant (K_m) was 5.6 mM, and the maximum velocity constant (V_{max}) was 45 nmol/min/mg protein. Accordingly, the cells of the present invention were confirmed to exhibit a concentration-dependent glucose transport capability.

10 Example 6

Transport capability of p-glycoprotein

Possession of a functional p-glycoprotein transport capability by cells TR-iBRB2 obtained in Example 2 was examined by measuring the uptake of cyclosporin A (CyA) which is the substrate of the p-glycoprotein and comparing the results with the uptake capability under the presence of verapamil which is a p-glycoprotein inhibitor. Specifically, TR-iBRB cells were inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of 1×10^5 cell/well/mL culture solution and incubated at 33°C in a CO₂ incubator to be the cells confluent. The CyA uptake was determined according to the following procedure. After removing the medium by aspiration, the cells were washed with a previously heated (37°C) uptake buffer containing glucose (which was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose by bubbling 5% CO₂-95% O₂ into the solution for 20 minutes and adjusting the pH of the

resulting solution to 7.4 with NaOH (this is hereinafter designated as uptake buffer (2)). After the addition of 0.2 mL of uptake buffer (2) containing 0.25% DMSO heated to 37°C, the cells were preincubated for 30 minutes. Then, the uptake
5 buffer (2) was removed and 0.2 mL of uptake buffer (2) containing 37 kBq/mL of [³H]CyA, 0.075 µM of non-labeled CyA, and 0.25% DMSO, heated to 37°C, was added. For the measurement of uptake in the presence of verapamil, 0.2 mL of uptake buffer (2) containing 100 µM of verapamil and 0.25% DMSO heated to 37°C
10 was added, and the cells were preincubated for 30 minutes, followed by the removal of the uptake buffer (2) and the addition of 0.2 mL of uptake buffer (2) containing 37 kBq/mL [³H]CyA, 0.075 µM non-labeled CyA, 100 µM verapamil, and 0.25% DMSO, heated to 37°C. Both uptake reactions were carried out for 30
15 minutes. After removing the reaction solution, the residue was washed with uptake buffer (2) at 4°C three times, and cells were solubilized overnight with the addition of 1 mL of 1N NaOH. Then, the radioactivity was determined using a liquid scintillation counter. As a result, a significant increase in the uptake amount
20 of about 1.8 times was confirmed. Specifically, the cell/medium uptake ratio of [³H]CyA which is the substrate of the p-glycoprotein was 270 µL/mg protein, whereas the cell/medium uptake ratio of [³H]CyA in the presence of 100 µM verapamil which is an inhibitor of the p-glycoprotein was 490 µL/mg protein.
25 The same results were obtained with other cells.

Example 7

Confirmation of function of scavenger receptor

Possession of a functional scavenger receptor in cells of TR-iBRB2 obtained in Example 2 was examined by measuring uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) labeled with a fluorescence labeling material, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate. Specifically, TR-iBRB2 cells were inoculated on a cover glass at a concentration of 1×10^5 cells/well/mL medium and incubated at 33°C in a CO₂ incubator for 48 hours to be the cells confluent. The Dil-Ac-LDL uptake was determined according to the following procedure. After removing the medium by aspiration, the cells were washed with the uptake buffer (2) previously heated to 37°C. Next, 0.2 mL of the uptake buffer (2) containing 10 µg/200 µL Dil-Ac-LDL which was heated to 37°C was added, followed by incubation in a CO₂ incubator for 30 minutes. After 4 hours, the uptake buffer (2) was removed and the residue was washed with the uptake buffer (2) at 4°C. After the addition of 3% formaldehyde/PBS and immobilization by allowing to stand at room temperature for 20 minutes, fluorescence uptaken into cells were measured using a confocal laser scanning microscopy. As a result, uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL) labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate, which is a scavenger receptor ligand, into the cells was confirmed. The same results were obtained with other cells.

25 Example 8

Isolation of choroid plexus epithelial cells

In a clean bench, the brain was collected from one

transgenic rat carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 obtained in Example 1. The choroid plexus from the inner wall of the right and left ventriculus lateralis through the upper wall of the third ventricle of the brain was collected and thoroughly washed with PBS. The tissue was cut into pieces with a volume of 1-2 mm³ in 2 mL of ice-cooled PBS. The tissue pieces were suspended into 1 mL of a 10X trypsin/EDTA solution (0.5% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) to digest by the enzyme treatment at 37°C for 20 minutes. The tissue pieces were dispersed by gently stirring from time to time. The resulting cells were washed with a culture medium (DEME solution containing 10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, and 100 µg/mL streptomycin sulfate). The cells were dispersed in 2 mL of the culture and inoculated in a 35mmØ culture dish (Falcon, manufactured by Becton Dickinson Co.) and incubated (primary culture) at 33°C in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, saturated humidity). Subculture was carried out at an interval of about one week using a trypsin/EDTA solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) while replacing the medium twice a week. After subculture three times, 10²-10³ cells were inoculated in a 10 cmØ culture dish and incubated in a CO₂ incubator at 33°C to form colonies. After 7-10 days while replacing the medium twice a week, the colonies consisting of cells having a paving stone-like form inherent to epithelial cells which exhibit a comparatively fast growth rate were isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. The cells which were obtained were again inoculated in a 10 cm

○ ○

φ culture dish and incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated using a penicillin cup to obtain five lines of cells (TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5).

5 TR-CSFB3 was deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries. The deposition number is FERM BP-6508.

Example 9

10 Confirmation of large T-antigen proteins

Expression of large T-antigen proteins in the five cell lines obtained in Example 8 were examined by the Western Blotting method (Experimental Medicine Separate Volume, Biotechnology Manual UP Series, "Cancer research protocol by the molecular biological approach", pages 108-115, YODOSHA Publishing Co., 1995). The five cell lines (the 10th generation) were cultured in a 90 mm φ culture dishes until saturation. The collected cells were solubilized using 1 mL of 3% SDS-PBS (pH 7.4) and unsolubilized fractions were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes, and then the total amount of proteins was determined by the Bradford method using the protein assay kit II of BIO-RAD Co. The proteins were separated by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the amount of 20 μg each and transferred onto nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes blocked by a 3% skimmed milk solution were reacted with an anti-SV40 large T-antigen mouse antibody (DP02-C, CALBIOCHEM Co.), as a primary antibody, and a HRP labeled

15
20
25

anti-mouse IgG antibody A (Amersham Co.), as a secondary antibody, to detect the reactions specific to large T-antigen proteins using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1, a product of Amersham Co.). The results are shown in Table 3.

5 As a result, the large T-antigen proteins were detected in all five cell lines.

Table 3

Cells	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T-Antigen	+	+	+	+	+

10 Example 10

Confirmation of transport carrier of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1

The cells obtained were cultured in a mono-layer and expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transporter on the cell membrane was confirmed by confocal laser scanning microscopy observation of immunologically stained cells. the TR-CSFB3 cells obtained in Example 8 were cultured on a collagen coated coverglass in a 35mm ϕ dish (a product of Falcon). After removal of the culture solution, the cells were thoroughly washed with PBS, then 4 mL of a fixative (PBS containing 3% paraformaldehyde and 2% sucrose) was added. After allowing to stand at room temperature for 15 minutes, the cells were thoroughly washed with PBS. 2 mL of a blocking solution (Block Ace, manufactured by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) was added and the mixture was allowed to stand for one hour at 37°C to effect blocking, followed by the reaction with a primary antibody (anti $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

15
20
25

ATPase β 2 rabbit antibody, a product of UBI, or anti-GLUT-1 rabbit antibody, a product of Chemicon) for one hour at room temperature. The resulting product was washed four times with PBS and reacted with a secondary antibody (FITC labeled anti-rabbit IgG, a product of Capel) for one hour at room temperature, followed by washing with PBS four times. Finally, labeled cells were sealed with a glycerol sealing solution (a 90% glycerol solution in PBS containing 0.1% (v/v) of PermaFluor (a product of Lipshaw)). The cover glass periphery was sealed with a manicure. A confocal laser scanning microscopy (CLSM; Zwiss LSM 410, manufactured by Zwiss) was used for the observation. As a result, as shown in Figure 2, expression of Na⁺-K⁺ ATPase and GLUT-1 transporter were detected in TR-CSFB3 cells. In particular, Na⁺-K⁺ ATPase which is present on the basolateral membrane side (a serous membrane side) in other epithelial cells was seen to be locally present in the apical side of the cell membrane, confirming that the cells are choroid plexus epithelial cells. The same results were obtained with other cells.

Example 11

20 Confirmation of proline transport capability

The concentration dependency of the resulting cells on the L-proline transport was examined to determine the L-proline transport capability. This was compared with the reported values of L-proline transport capability in the choroid plexus, thereby confirming that the resulting cells have functions as the choroid plexus epithelial cells.

Specifically, TR-CSFB3 cells obtained in Example 8 were

inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of 3×10^5 cells/well/mL and incubated for 24 hours at 33°C in a CO₂ incubator to be the cells confluent. After removal of the medium by aspiration, the cells were washed with a previously heated (37°C) uptake buffer (1), which was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, and 25 mM NaHCO₃ by bubbling 5% CO₂-95% O₂ into the solution for 20 minutes and adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH.

0.2 mL of uptake buffer (1) containing 185 KBq/mL of [³H]-L-proline and heated to 37°C was added. Solutions containing proline at different concentrations were prepared by adding non-labeled L-proline to uptake buffer (1) to make final concentrations of 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 mM. After the uptake reaction for 30 minutes and washing three times with PBS, 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 was added and the mixture was allowed to stand overnight to solubilize the cells. The radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (LS-6500 made by Beckmann Co.). In addition, the amount of proteins was determined using a protein assay kit manufactured by Bio-Rad Co. Using the plot formula for the uptake rate vs. the L-proline concentration ($V = V_{\max} \times [S] / (K_m + [S])$), wherein V_{\max} indicates a maximum velocity constant, K_m indicates the Michaelis constant, and $[s]$ is a substrate concentration), the K_m and the V_{\max} for L-proline uptake were analyzed using the non-linear minimum square program (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885). The results are shown in Figure

3. As a result, it was confirmed that the uptake of L-proline ([³H]-L-proline) was concentration-dependent, the K_m was 1.5 mM, and the V_{max} was 2.4 nmol/min/mg protein. The value for K_m as determined was similar to the K_m value from rabbit choroid plexus of 1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82). This confirms that the resulting cells possess the function of choroid plexus epithelial cell line.

Example 12

Inhibition of proline active transport by choline and ouabain

The L-proline uptake into the isolated choroid plexus is dependent on Na⁺. Therefore, the Na⁺ dependency of the L-proline uptake by the cells obtained was confirmed, and then the cells were confirmed to have functions as the choroid plexus epithelial cells in the same way as in Example 11. However, because the experiment must be carried out under Na⁺-free conditions, all Na⁺ in the uptake buffer (1) was replaced with coline. For the confirmation of the effect of ouabain, the uptake buffer (1) containing a tracer to which 1 mM of ouabain was added was used (because ouabain is an inhibitor of Na⁺ -K⁺ ATPase, the concentration gradient of Na⁺ is disappeared.). Both reactions were carried out for 30 minutes. The results are shown in Figure 4. It was confirmed that L-proline uptake was inhibited as much as 98% under Na⁺-free conditions. It was confirmed that 56% of L-proline uptake was inhibited by 1 mM ouabain. As a result, the L-proline uptake of TR-CSFB3 cells was confirmed to be Na⁺-dependent. This confirms that the resulting cells possess the function of choroid plexus epithelial cell line.

Example 13

Separation of brain capillary endothelial cells

Separation of capillary vessel endothelial cells from the rat brain was carried out according to the method similar to the method of Example 2. The cerebrum was collected from one transgenic rat carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 obtained in Example 1. The collected cerebrum was sufficiently washed with an ice-cooled buffer for preparation (HBSS containing 10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, and 0.5% bovine serum albumin) in a clean bench, cut into pieces each having a volume of 1-2 mm³, and placed in a 1 mL taper-type Teflon homogenizer (WHEATON Co.). 1 mL of the ice-cooled buffer was added and the mixture was homogenized by four up-and-down strokes to obtain a slurry. The slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. The pellets were suspended in a 1 mL enzyme solution (HBSS containing 0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim) 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μ g/mL tosyl-lysine-chloromethylketone) to digest with the enzyme in a water bath with shaking at 37°C for 30 minutes, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. The enzyme treated slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. The pellets thus obtained were suspended in 10 mL of HBSS containing 16% dextran to remove unnecessary tissues. The pellets of capillary vessel fractions were obtained by centrifugation

(1,000 g, 15 minutes, 4°C). The pellets were suspended again in a 1 mL of enzyme solution and treated at 37°C for 30 minutes to digest the capillary vessels into a fine piece. The enzyme treated slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. Next, the pellets obtained were dispersed in a 2 mL of culture medium (DMEM containing 15 µg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 2.50 µg/mL amphotericin B) and inoculated in a 35 mm ϕ culture plate coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The cells were incubated (primary culture) at 33°C in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, saturated humidity). Subculture was carried out by recovering the cells using a trypsin solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) and suspending the cells in a medium. The medium was replaced twice a week. Subculture was carried out at an interval of one week. After subculturing three times, 10²-10³ cells were inoculated in a 100 mm ϕ culture dish coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The cells were incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies. After 7-10 days while replacing the medium twice a week, the colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. The cells obtained were again inoculated in a 100 mm ϕ culture dish and incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated using a penicillin cup to obtain five lines of cells (TR-BBB1, TR-BBB5, TR-BBB6, TR-BBB11, and TR-BBB13). These

cell lines exhibited a form similar to spindle fibers specific to endothelial cells.

Example 14

Confirmation of large T-antigen proteins

5 Expression of large T-antigen proteins in the five cell lines obtained in Example 13 was examined by the Western Blotting method (Experimental Medicine Separate Volume, Biotechnology Manual UP Series, "Cancer research protocol by the molecular biological approach", pages 108-115, YODOSHA Publishing Co., 10 1995). The five cell lines (the 20th generation) were cultured in a 90mm ϕ cultured dishes until saturation. The recovered cells were solubilized using 3% SDS-PBS (pH 7.4), unsolubilized fractions were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes, and then the total amount of proteins was determined 15 by the Bradford method using the protein assay kit II of the BIO-RAD Co. The proteins were separated by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the amount of 20 μ g each and transferred onto nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes blocked by a 3% skimmed milk solution 20 were reacted with an anti-SV40 large T-antigen mouse antibody (DP02-C, CALBIOCHEM Co.), as a primary antibody, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.), as a secondary antibody, to detect the reactions specific to large T-antigen proteins using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1, a 25 product of Amersham Co.). As a result, the expression of large T-antigen proteins was detected in all five cell lines.

Table 4

Cells	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
T-Antigen	+	+	+	+	+

Example 15

Identification of cells

5 The cells obtained in Example 13 were identified to be brain capillary endothelial cells by confirming the expression of a GLUT-1 transporter and p-glycoprotein by the Western Blotting method. Using nitrocellulose membranes prepared in the same manner as in Example 14, the cells obtained were reacted
10 with an anti-GLUT-1 mouse antibody (Temecular, CA, Chemicon Co.) or an anti-p-glycoprotein rabbit antibody (anti-mdr antibody, Oncogene Research Products Co.), as primary antibodies, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.) or a HRP labeled anti-rabbit IgG antibody (Cappel Co.), as secondary
15 antibodies, to detect the reactions specific to GLUT-1 protein or p-glycoprotein using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1, Amersham Co.). As a result, the GLUT-1 protein and p-glycoprotein were detected in all five cell lines. Therefore, the five cell lines obtained were identified to be brain capillary
20 endothelial cells.

Table 5

Cells	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
GLUT-1	+	+	+	+	+
P-Glycoprotein	+	+	+	+	+

Example 16

Confirmation of glucose transport capability

The 3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) uptake capability was determined using the cells TR-BBB1, TR-BBB5, TR-BBB6, TR-BBB11, and TR-BBB13 obtained in Example 13 to confirm that the cells possess a functional GLUT-1 transport carrier, thereby confirming the concentration-dependent glucose transport capability. As a result, it was confirmed that the uptake of $[^3\text{H}]$ 3-OMG which is the substrate of the GLUT-1 was concentration-dependent, and the initial uptake rate was 7.07-10.2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

Table 6

Cells	Initial uptake rate ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
TR-BBB1	8.12 ± 0.62
TR-BBB5	10.1 ± 1.32
TR-BBB6	7.07 ± 0.92
TR-BBB11	10.2 ± 0.62
TR-BBB13	8.96 ± 0.50

Example 17

Confirmation of function of scavenger receptor

Possession of a functional scavenger receptor by cells TR-BBB13 obtained in Example 13 was analyzed by measuring uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) labeled with a fluorescence reagent,

1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate. The method used was done according to the method described in Example 7 was followed. Specifically, TR-BBB13 cells were inoculated on a cover glass at a concentration of 1×10^5 cells/well/mL medium and incubated at 33°C in a CO_2 incubator for 48 hours to be the cells confluent. For the determination of the uptake of Dil-Ac-LDL, after removing the medium by aspiration, the cells were washed with a previously heated (37°C) uptake buffer (2), which was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO_3 , and 10 mM D-glucose by bubbling 5% CO_2 -95% O_2 into the solution for 20 minutes and adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH. Next, 0.2 mL of the uptake buffer (2) containing $10 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ of Dil-Ac-LDL which was heated to 37°C was added, followed by incubation in a CO_2 incubator for 30 minutes. After 4 hours, the uptake buffer (2) was removed and the residue was washed three times with the uptake buffer (2) at 4°C . After the addition of 3% formaldehyde/PBS and immobilization by allowing to stand at room temperature for 20 minutes, fluorescence uptaken into cells were measured using a confocal laser scanning microscopy. As a result, uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL) labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate, which is a scavenger receptor ligand, into the cells was detected. The same results were obtained with other cells.

Example 18

Confirmation of alkaline phosphatase and
 γ -glutamyltranspeptidase activities

Expression of the alkaline phosphatase and
 γ -glutamyltranspeptidase activities, which are expressed by the
5 capillary endothelial cells, by the cells obtained in Example
13 were determined by a conventional method. The determination
was carried out using Alkaline Phospha B-Test Wako and γ -GTP-Test
Wako (manufactured by Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) according
to the standard measuring method described in the instruction
10 manual for each kit. In addition, the amount of proteins was
determined according to the Bradford method (Protein Assay Kit
II manufactured by Bio-Rad Co.).

The alkaline phosphatase activity and the
 γ -glutamyltranspeptidase activity were found to be 8.7–25.8%
15 and 5.4–22.6%, respectively, on the basis of the rat brain
capillary vessel rich fractions as a control, thus confirming
expression of enzymes specific to brain capillary endothelial
cells.

20 Table 7

Cells	Alkaline phosphatase activity (μ U/mg protein (% of control))	γ -Glutamyltranspeptidase activity (μ U/mg protein (% of control))
-------	---	--

TR-BBB1	23.7 ± 7.17 (25.8%)	3.62 ± 0.47 (12.4%)
TR-BBB5	11.9 ± 2.92 (13.0%)	2.05 ± 0.76 (7.0%)
TR-BBB6	22.3 ± 8.78 (24.3%)	1.58 ± 0.52 (5.4%)
TR-BBB11	8.05 ± 2.37 (8.7%)	6.60 ± 0.93 (22.6%)
TR-BBB13	13.7 ± 3.92 (14.9%)	5.60 ± 1.08 (19.1%)
Control (Brain Capillaries)	91.8 ± 30.8 (100%)	29.2 ± 11.8 (100%)

INDUSTRIAL APPLICABILITY

Established cells originating from retinal capillary endothelial cells, which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, are provided by the present invention. Furthermore, a method of establishing immortalized cells is provided, which comprises homogenizing the retinal tissue of a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58, separating capillary vessels, treating the resulting retinal capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells.

Such established cells of the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and-outside polarity when culturing in culture dish. Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs into the retina by the assessment of drug uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal parenchyma, studying the transport mechanism of

permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicology of drugs on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition, a blood retinal barrier can be reconstructed in a test tube (in vitro) by coculture with Mueller cells which are a kind of glia cells. The cell strains of the present invention are therefore useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to the maintenance of intraocular homeostasis and functional disorders of retinal tissues on the cellular level studies.

Moreover, cell lines derived from choroid plexus epithelial cells are provided. The cells express a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, show localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, show the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the apical side. Also provided is a method of establishing immortalized cells, which derived from choroidal tissues of a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58 by protease treatment.

Due to the capability of forming tight junctions among cells when cultured in a mono-layer on a porous flat membrane and the capability of reconstructing the blood-cerebrospinal fluid barrier with a inside-and-outside polarity in vitro, the established cells are useful for studying nutrition metabolism in the brain, studying permeation of drugs into the brain, and investigating the protection mechanism of metabolism and

permeation of substances into the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain in cellular level studies.

Furthermore, established cells derived from brain capillary endothelial cells, which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, are provided by the present invention. Still further, a method of establishing immortalized cells is provided, which comprises homogenizing the cerebrum tissue of a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58, separating capillary vessels, treating the resulting brain capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells.

Due to the capability of producing a mono-layer of the brain capillary endothelial cells when cultured on a Petri dish and of reconstructing the blood-brain barrier in vitro, the established cells are useful for studying the blood-brain barrier which restricts movement of substances to the brain tissues from blood, specifically, studying the nutrition metabolism in the brain and permeation of drugs into the brain, and investigating the protection mechanism in the blood-brain barrier. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition

metabolism disorders and homeostatic functional disorders of
the brain through cellular level studies.

REMARKS TO DEPOSITED MICROORGANISMS

Name and address of the organization in which the microorganisms have been deposited:

5 Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology,
 Agency of Industrial Science and Technology, The
 Ministry of International Trade and Industry
 Address: 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
 (Postal Code: 305-3566).

10 Date of deposition: September 18, 1998

 Number of deposition given by the deposition organization:
 FERM BP-6507

15 Name and address of the organization in which the microorganisms
 have been deposited:

 Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology,
 Agency of Industrial Science and Technology, The
 Ministry of International Trade and Industry
 Address: 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
20 (Postal Code: 305-3566).

 Date of deposition: September 18, 1998

 Number of deposition given by the deposition organization:
 FERM BP-6508

25 Name and address of the organization in which the microorganisms
 have been deposited:

 Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology,

Agency of Industrial Science and Technology, The
Ministry of International Trade and Industry

Address: 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
(Postal Code: 305-3566).

5. Date of deposition: September 22, 1999

Number of deposition given by the deposition organization:

FERM BP-6873

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An immortalized cell established from a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced.

2. The immortalized cell according to claim 1, wherein the transgenic animal is a rat.

3. An established cell derived from retinal capillary endothelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein.

4. The established cell according to claim 3, having a deposition number of FERM BP-6507.

5. A method of establishing an immortalized cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, the method comprising treating retinal capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

6. An established cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, the cell obtained by treating retinal capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

7. An established cell derived from choroid plexus epithelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40

large T-antigen gene, shows localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the apical side.

5 8. The established cell according to claim 7, having a deposition number of FERM BP-6508.

9. A method of establishing an immortalized cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transporter in
10 the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the apical side, the method comprising treating choroidal epithelium tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and
15 subculturing the resulting cells.

10. An established cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase
20 in the apical side, which is obtained by treating choroidal epithelium tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

25 11. An established cell derived from brain capillary endothelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, p-glycoprotein, alkaline

phosphatase, and γ -glutamyltransferase.

12. The established cell according to claim 11, having a deposition number of FERM BP-6873.

13. A method of establishing an immortalized cell which
5 expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, p-glycoprotein, alkaline phosphatase, and γ -glutamyltransferase, the method comprising treating brain capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has
10 been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

14. An established cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, p-glycoprotein, alkaline phosphatase, and γ -
15 glutamyltransferase, the cell obtained by treating brain capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

ABSTRACT OF DISCLOSURE

Established cells derived from retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells, or brain capillary endothelial cells or a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58. The cell line derived from retinal capillary endothelial cells expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein. The cell line derived from choroid plexus epithelial cells expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene and shows localization of Na⁺ -K⁺ ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane. When cultured in a monolayer, it shows the localization of Na⁺ -K⁺ ATPase in the apical side. The cell line derived from brain capillary endothelial cells expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, p-glycoprotein, alkaline phosphatase, and γ - glutamyltransferase.

A method of establishing immortalized cells by subculturing cells obtained from retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells, or brain capillary endothelial cells of the above-described transgenic animal. These cells are useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism in retinal tissues and brain on cellular level studies.

Figure 1

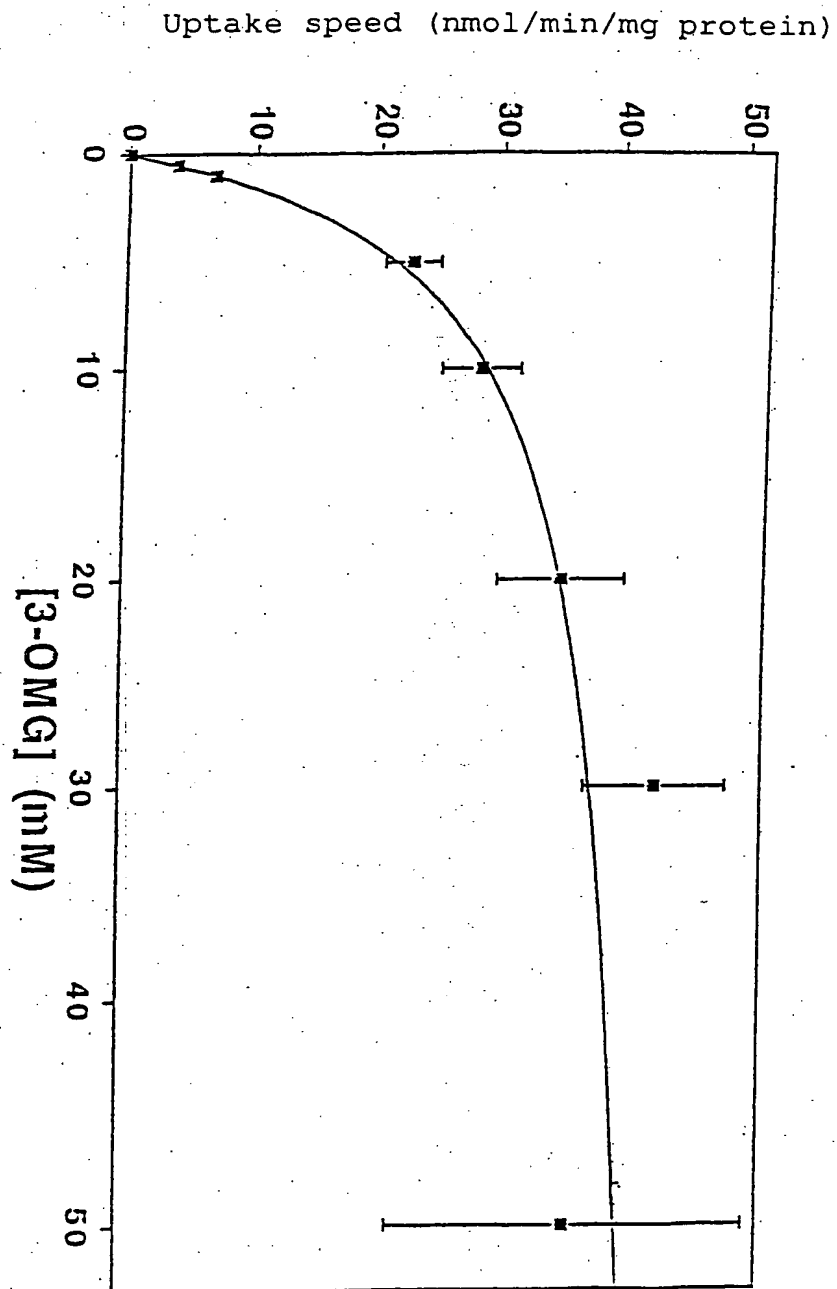
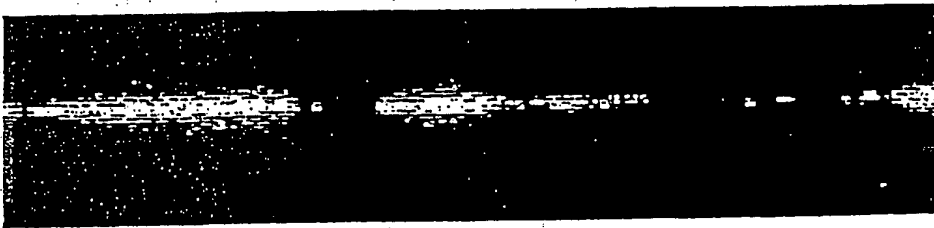
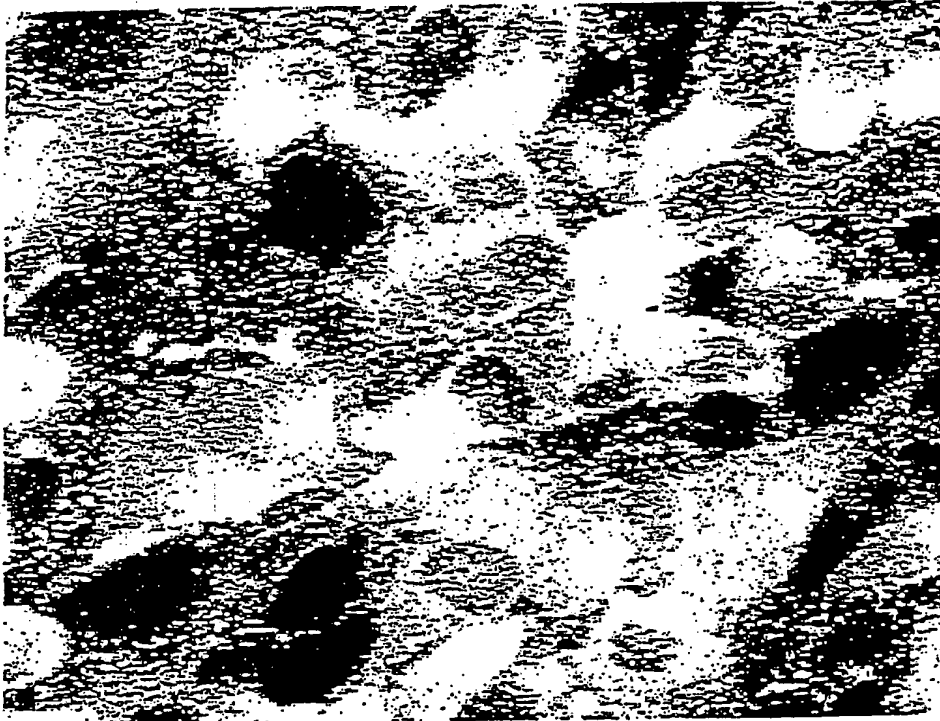


Figure 2



←apical side
←basolateral side

Figure 3

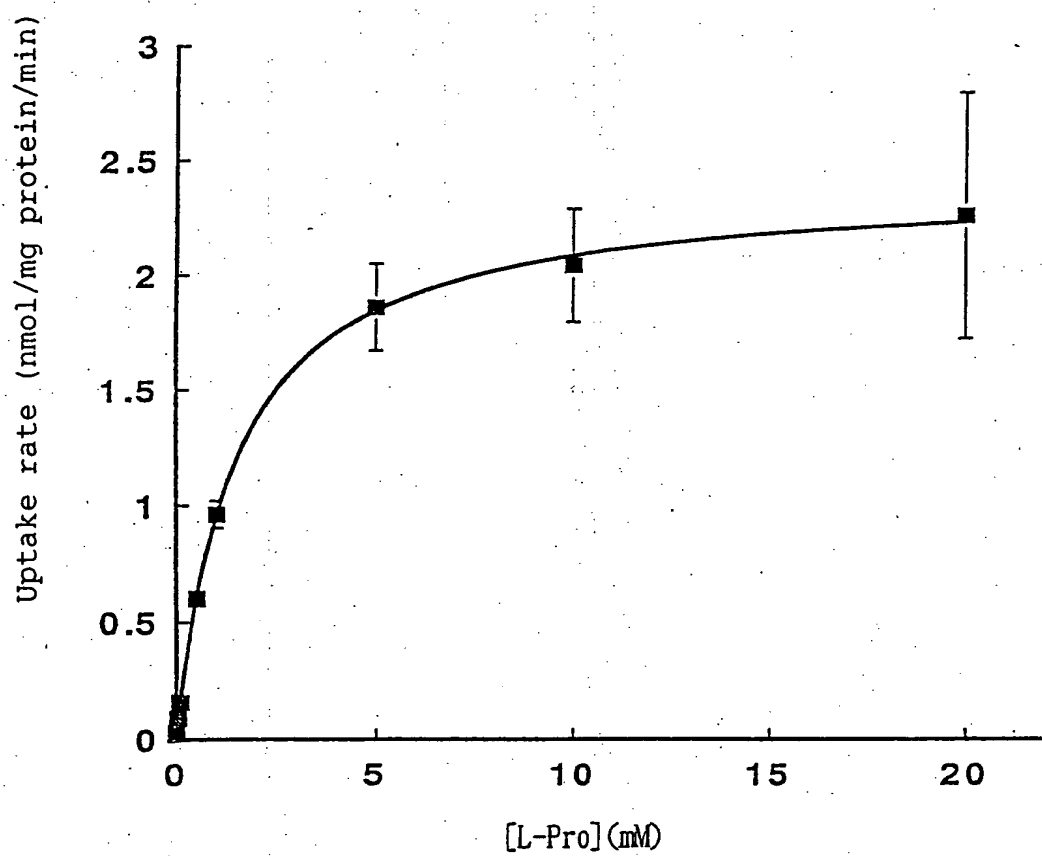
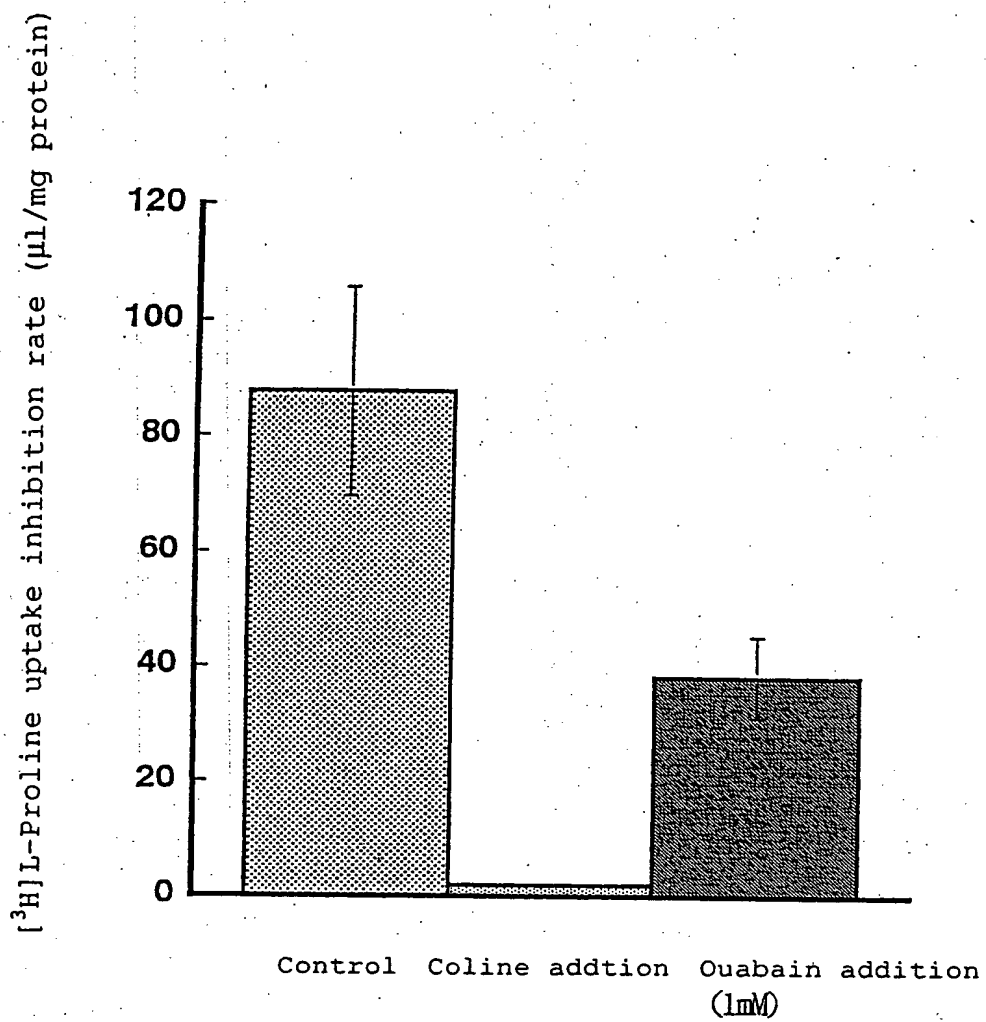


Figure 4





(51) 国際特許分類7 C12N 15/37, 5/16, 5/18, 15/63, A01K 67/027	A1	(11) 国際公開番号 WO00/20599
		(43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05423	(74) 代理人 帯刀益夫(OBINATA, Masuo)[JP/JP] 〒980-0871 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402 Miyagi, (JP)
(22) 国際出願日 1999年10月1日(01.10.99)	(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10/296138 1998年10月2日(02.10.98) 特願平10/296139 1998年10月2日(02.10.98)	(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, FI, FR, GB, IT, NL, SE)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ワイエスニューテクノロジー研究所 (YS NEW TECHNOLOGY INSTITUTE INC.)[JP/JP] 〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 519番地 Tochigi, (JP)	添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 細谷健一(HOSOYA, Kenichi)[JP/JP] 〒982-0826 宮城県仙台市太白区三神峰1丁目3番地 3-501号 Miyagi, (JP)	
寺崎哲也(TERASAKI, Tetsuya)[JP/JP] 〒981-3101 宮城県仙台市泉区明石南2-1-5 Miyagi, (JP)	
上田正次(UEDA, Masatsugu)[JP/JP] 〒350-1151 埼玉県川越市今福1672-1-719 Saitama, (JP)	

(54) Title: ESTABLISHED CELLS

(54) 発明の名称 樹立細胞

(57) Abstract

Established cells derived from the retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells or brain capillary endothelial cells of a transgenic animal carrying a large T antigen gene of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58. The cell line derived from the retinal capillary endothelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen, a GLUT-1 carrier and a p-glycoprotein. The cell line derived from the choroid plexus epithelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen gene and shows the localization of Na⁺-K⁺ ATPase and the GLUT-1 carrier in the cell membrane. When cultured in a monolayer, it shows the localization of Na⁺-K⁺ ATPase in the apical side. The cell line derived from the brain capillary endothelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen, the GLUT-1 carrier, the p-glycoprotein, alkaline phosphatase and γ-glutamyltransferase. A method for establishing immortalized cells by subculturing cells obtained from the retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells or brain capillary endothelial cells of the above-described transgenic animal. These cells are useful in screening drugs regarding the safety or efficacy thereof and studying for developing methods for the diagnosis or treatment of diseases relating to nutritional metabolism in retinal tissues and brain at the cellular level.

(57)要約

SV40温度感受性突然変異性 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来、脈絡叢上皮細胞由来、又は脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞の提供。

網膜毛細血管内皮細胞由来株は、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する。脈絡叢上皮細胞由来株は、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する。脳毛細血管内皮細胞株は、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリフォスファターゼ及び γ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する。

前記トラスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞、又は脳毛細血管内皮細胞から得られる細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、網膜組織や脳の栄養代謝等に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム

明 細 書

樹 立 細 胞

技術分野

本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞に関する。

より具体的には、本発明は、そのトランスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。又、グリア細胞の一種のミュラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明は、そのトランスジェニック動物の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞は、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究や脳脊髄での物質代謝や透過の防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有用である。

さらに、本発明は、そのトランスジェニック動物の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞は、血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

背景技術

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する技術の実用レベルでの活用が開始されている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なうことがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞の特性は、生体組織から採取する度にその特性が異なる危惧に加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には、試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞では、安定して均一の特性を持つが、このような細胞の多くは、その細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失しているため、このような細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。そこで、初代

ルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスの HPV16遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても、対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作製して、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現は、温度を変えることによって操作することができるため非常に有効である (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244)。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、各種臓器からの細胞株の樹立に供する細胞を調製する上で、特に、網膜毛細血管内皮細胞あるいは脳内のような微小器官に由来する細胞 (例えば脈絡叢上皮細胞、毛細血管内皮細胞など) を株化する場合には、器官あるいは組織を分離して初代細胞あるいは多数の細胞を容易に得ることができるため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることによって操作

することができる不死化細胞の樹立に有効なSV40の温度感受性突然変異株 tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを既に作製した。

一方、血液眼関門の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる網膜毛細血管内皮の初代細胞を用いる方法が試みられるようになってきている。この場合に、試験に供するに足る細胞を小型の実験動物から得ることが難しいため、ウシ等の大型の家畜の眼球を使用しなければならない。例えば、20個のウシの眼球から網膜毛細血管内皮細胞を単離して2回の継代培養を行なっても約 9×10^6 個の細胞しか得られず (Wong H. C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol, Visual, Sci., 28, 1767-1775)、医薬品のスクリーニングには大量のウシの眼球が必要であった。このため、これに替わる有効な網膜毛細血管内皮細胞株の提供が切望されていた。

また同様に、神経作用性の薬物の血液脳脊髄関門^系防御機構に対する作用機作の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脈絡叢上皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常的に小型実験動物から得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

さらに、血液脳関門の防御機構に対する薬物の脳内への移行や作用機構の解明は薬物の毒性研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脳血管内皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常的に得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

発明の開示

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意研究の結果、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの網膜組織から網膜毛細血管を分離し、得られた毛

に至った。

従って本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

さらに、本発明者らは、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳の脈絡叢から上皮細胞株を分離し、不死化細胞を樹立するに至った。

従って本発明は、脈絡叢上皮細胞由来であって温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異体 tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて、このような不死化細胞を樹立する方法を提供することを課題とする。

また同様に、本発明者らは、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳から脳毛細血管を分離し、得られた毛細血管から脳毛細血管内皮細胞を分離することにより、不死化細胞を樹立するに至った。

従って本発明は、脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリホスファターゼ、及びγ-グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

本発明は、このような課題を解決するためになされたものであってSV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞に関する。具体的には、本発明は、このようなトラン

スジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に受託番号 FERM BP-6507 として寄託された細胞を挙げることができる。

また、本発明は、このようなトランスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞を樹立する方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明は、このような樹立方法で樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給及び代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミュラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明は、このようなトランスジェニック動物の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 SV40 ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ が局在する樹立細胞に関する。このような樹立細胞

M BP-6508 として寄託された細胞を例示することができる。

本発明は、このようなトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から上皮細胞様に敷石状の形態を示す細胞を継代培養することよりなる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明は、このようにして樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝、恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

さらに、本発明は、このようなトランスジェニック動物の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を発現し、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性を保持し、スカベンジャーレセプター、GLUT-1 輸送担体、及び p-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては日本通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-6873 として寄託された細胞株を例示することができる。

本発明は、このようなトランスジェニック動物の脳組織から脳毛細血管を分離し、得られた毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から内皮細胞特異的なスピンドルファイバー状の形態を示す細胞を継代培養することよりなる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明はこのようにして樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して、表裏極性をもつ血液脳関門を試験内で再構築することができるため、血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施例5の樹立細胞(TR-iBBB2)の3-OMGの取り込み速度の基質濃度依存性を示す。

第2図は、本発明の実施例10の樹立細胞(TR-CSFB3)の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseの共焦点レーザースキャン顕微鏡写真を示す。

上の写真は上面からみた顕微鏡写真で $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及び GLUT-1 の発現がみられる。下の写真は、断面の顕微鏡写真で頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在している。

第3図は、本発明の実施例11の樹立細胞株(TR-CSFB3)のプロリン能動輸送能を示す。

第4図は、本発明の実施例12の樹立細胞(TR-CSFB3)のプロリン能動輸送能のコリン、ウアバインによる阻害を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複

で開環して pBR322 に導入したプラスミド pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素 BamHI で切断してベクター部位を除去する。この様にして得られた tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を持つ DNA (5,240bp) には、ラージ T 抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、この DNA を導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子 (tsA58 のラージ T 抗原遺伝子) が発現することになる。

次に、この様にして得られた DNA を常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージ T 抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作製する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか 多分化能を有する ES 細胞 が挙げられる。この様な卵子や培養細胞への DNA 導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。

更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること (核移植) で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでに tsA58 のラージ T 抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作製することができる。

次に、この様にして作製した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞 (初代細胞) を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製することができる。得られた細胞は 33~37℃ において永久的増殖能を持ち、39℃ においては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。

このラットの眼球より網膜を摘出して細切し、テーパー型テフロン製ホモゲナ

イザーで組織を磨り潰して得られたスラリーを遠心してペレットを得る。得られたペレットを酵素（プロテアーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、25%ウシ血清アルブミンを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行うことで毛細血管を細切した後、培養シャーレーに播種する。2回の継代の後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行うことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は、tsA58 のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウェスタンブロッティング法で検定することにより、不死化網膜毛細血管内皮細胞と同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33℃において良好な増殖性を示し、網膜毛細血管内皮細胞としての機能を保持した細胞である。

また、このラットの脳を摘出して脈絡叢を採取する。細切した脈絡叢をトリプシン/EDTA で処理して細胞を遊離させ、血清を添加した培養液を加えて、酵素反応を停止させた後、細胞は遠心により回収し、培養液に分散させ、更に、遠心して回収する操作を繰り返して洗浄する。得られた細胞を培養液に分散して培養プレートに播種し、33℃で培養し、3回の継代の後コロニー形成を行い、ペニシリンカップを用いて上皮細胞特有の敷石状の形態を示す増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離する。この操作を2回行うことで、単細胞に由来する細胞を単離する。得られた各細胞について免疫染色を行い、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体の細胞膜上の局在性を、共焦点レーザー顕微鏡で検定して細胞を同定する。得られた細胞はラージT抗原を発現し、50回の継代後も33℃において

membrana serosa

特に単層培養したときに他の上皮細胞では側底膜側（漿膜側）に存在する Na^+/K^+ ATPaseが頂側膜(apical)側の細胞膜上に局在する細胞株である。

また同様に、このラットの脳を摘出して大脳を採取する。細切した大脳をデーパー型テフロンホモゲナイザーで組織を磨り潰して得たスラリーを16%デキストランで遠心してペレット（脳毛細血管画分）を得た。得られた脳毛細血管画分を酵素（コラゲナーゼ/ディスパーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、16%デキストランを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行なうことで毛細血管を細切した後、培養シャーレーに播種する。33℃、炭酸ガス培養器内（5% CO_2 -95% 空気、飽和湿度）で培養し、コンフルエントに達した細胞をトリプシン処理により細胞を剥離・分散して継代した。3回の継代後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行なうことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は、tsA58 のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウェスタンブロッティング法で検定し、更に、DiI-蛍光標識体のAcLDLの取り込みを共焦点レーザー顕微鏡により観察することでスカベンジャーレセプターの発現を認め、アルカリフォスファターゼとγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定して脳毛細血管内皮細胞であると同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33℃において良好な増殖性を示し、脳毛細血管内皮細胞の機能を保持した細胞である。

実施例

次に実施例をもって本発明を具体的に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

〔実施例 1〕

トランスジェニックラットの作製

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作製した。

① 導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR322の BamHI部位に導入し、Sfi I 配列をSacII に変換してSV40の複製起点(ori)を欠失する ori(-) としてのDNAクローンpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig. 1参照) から常法に従い調製した。すなわち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSVtsA58ori(-)-2を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動 (1% gel ; ベーリンガー社製) を用いてベクター部分を分離した5240bpのtsA58 のDNA (直鎖状 DNA断片) をゲルから切り出した。アガラーゼ処理 (0.6 unit/100mgゲル : Agarase ; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) に溶解して 170 μ g/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) で 5 μ g/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20℃で保存した。

② トランスジェニックラットの作製

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間)、温度23 \pm 2℃、湿度55 \pm

た。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性性腺刺激ホルモン〔日本ゼンヤク：PMS全葉 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)〕を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン〔三共臓器：プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)〕を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M. C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974))を使用した。採取した受精卵を 0.1% ヒアルロニダーゼ (シグマ社製：Hyaluronidase Type I-S)を含むmKRB液中で37℃、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作まで炭酸ガス培養器内 (5% CO₂-95% 空気, 37℃, 飽和湿度) に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228 個の卵を9匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR法により検定〔使用プライマー；tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (1365~1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTTGGCACTTG-3' (1571~1590部位に相当)〕した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹 (雄6匹、雌8匹、性別不明6匹) の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット (雄ライン：#07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン：#09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) を得た。これらのG₀世代のトランスジェニックラットとウイスターラットを交配し、雄ファウンダーの2ライン (#07-2, #07-5) と雌ファウンダーの3ライン (#09-7, #11-6, #19-8) において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。

〔実施例2〕

網膜毛細血管内皮細胞の分離

網膜からの網膜毛細血管内皮細胞の分離は Greenwoodの方法 (Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132)を改良して行なった。実施例1で得られたSV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット (1匹) より眼球を摘出した。クリーンベンチ内で氷冷した調製用緩衝液 (10mM Hepes, 100U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 0.5% ウシ血清アルブミンを含むHBSS) で摘出した眼球をよく洗浄した後、網膜組織を切り取り、組織を1~2 mm³ に細切した。細切した組織を1 mL用テーパー型テフロン製ホモゲナイザー (WHEATON 社製) に移し、1 mLの氷冷した調製用緩衝液を加え、4回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。得られたペレットを1 mLの酵素溶液 (0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 20U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μ g/mL tosyl-lysine-chloromethylketoneを添加したHBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37℃, 30分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。

得られたペレットから不要な組織を除去するため、10mLの25%ウシ血清アルブミンを含むHBSSにペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15分間, 4℃) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び1 mLの酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37℃, 30分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。次に、得られたペレットを2 mLの培養液 (15 μ g/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 2.50 μ g/mL amphotericin B を添加した DMEM) に分散して1枚の collagen type Iをコートした35mm ϕ 培養シャーレー (Be

和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を 1 週間に 2 回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; Gibco BRL 社製) を用いておよそ 1 週間隔で行った。2 回の継代の後、 $10^2 \sim 10^3$ 個の細胞を collagen type I をコートした 100mm ϕ 培養シャーレー (Becton Dickinson 社製) に播種した。33 $^{\circ}$ C の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を 1 週間に 2 回交換し、7 \sim 10 日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び 100mm ϕ 培養シャーレーに播種して 33 $^{\circ}$ C の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して 5 種の細胞 (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9) を得た。

この TR-iBRB2 を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に寄託した。受託番号は FERM BP-6507 である。

〔実施例 3〕

ラージ T 抗原タンパク質の確認

実施例 2 で得られた 5 種の細胞におけるラージ T 抗原蛋白質の発現をウェスタンブロット法 (実験医学別冊バイオマニュアル UP シリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」108 \sim 115 頁, 羊土社, 1995 年発行) により検討した。5 種の細胞 (継代数: 20) を 90mm ϕ 培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を 3% SDS-PBS (pH 7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000 rpm, 10 分間) して不溶画分を除去した後、ブラッドフォード法 (BIO-RAD 社製プロテインアッセイキット II を使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ 20 μ g の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3% スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に 1 次抗体として抗 SV40 ラージ T 抗原マウス抗体 (CALBIOCHEM 社製, DP02-C) を、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社製) を反応させ、ラージ T 抗原蛋白質

質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンブローティング検出システム (RPN2106M1)を用いて検出した。結果を第1表に示す。表中+はラージT抗原蛋白質に特異的な反応を検出できたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

第 1 表

細胞	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T抗原	+	+	+	+	+

〔実施例4〕

細胞の同定

実施例2で得られた細胞が網膜毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンブローティング法で検定することにより同定した。得られた各細胞について、実施例3と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗GLUT-1マウス抗体 (Chemicon社製, Temecula, CA)又は抗p-糖蛋白質ウサギ抗体 (抗mdr抗体、Oncogene Research Products社製)を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製)又はHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Cappel社製)を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいはp-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンブローティング検出システム (RPN2106M1)を用いて検出した。結果を第2表に示す。表中+は、GLUT-1蛋白質又はp-糖蛋白質の発現が確認されたことを示す。この結果、5種の細胞全てにおいてGLUT-1蛋白質及びp-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞が網膜毛細血管内皮細胞であることが同定された。

第 2 表

細胞	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
GLUT-1	+	+	+	+	+
P-糖蛋白質	+	+	+	+	+

〔実施例 5〕

グルコース輸送能の確認

実施例 2 で得られた細胞 TR-iBRB2 を使用し、3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) の取り込み能を測定し、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで機能的な GLUT-1 輸送担体を有することを確認した。即ち、24 穴細胞培養用プレートに TR-iBRB 株を 3×10^5 /ウェル/ mL となるように播き、33℃ の炭酸ガス培養器で 24 時間培養して細胞をコンフルエントにした。3-OMG の取り込みの測定は次の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後、37℃ に温めた 232kBq/mL の [3 H]3-OMG を含む uptake buffer を 0.2 mL 加えた。尚、本実施例において用いた uptake buffer はグルコースを含まないものであり、122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 の溶液を 5% CO_2 -95% O_2 で 20 分間バブリングして NaOH で pH7.4 に調整されたもの（以下 uptake buffer ① とする）である。10 秒後に uptake buffer ① を取り除き、4℃ の uptake buffer ① で洗浄した。以下、uptake buffer ① を取り除くまでの時間を 20 秒間、30 秒間、1 分間として同様の操作を行なった。細胞を 1% トライトン X-100 を含む 1 mL の PBS で一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、3-OMG の取り込み能の直線性を確認した。結果、20 秒間の取り込み時間を設定した。

次に、3-OMG の取り込みの基質濃度依存性を検討した。細胞を37℃に温めた uptake buffer ①で洗浄した後、37℃に温めた462kBq/ ウェルの $[^3\text{H}]$ 3-OMG を含む uptake buffer ①を0.2mL 加えた。ただし、非標識体の3-OMG を0, 0.5, 1.5, 10, 20, 30, 50mM含む uptake buffer①を使用して3-OMG の各濃度液とした。20秒後に uptake buffer ①を取り除き、4℃の10mM非標識体3-OMG を含む uptake buffer①で洗浄した。次に、1%トライトンX-100 を含む1 mLのPBS で一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。結果を図1に示す。尚、3-OMG の濃度に対する取り込み速度のプロット式 ($V = V_{\text{max}} \times [S] / (K_m + [S])$); V_{max} は最大速度定数、 K_m はミカエリス定数、 $[S]$ は基質濃度)を用いて 3- OMG の取り込みの K_m と V_{max} を非線形最少数二乗法プログラム (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885) を用いて解析した。この結果、GLUT-1の基質である $[^3\text{H}]$ 3-OMG の取り込みは濃度依存的であり、そのミカエリス定数 (K_m)は 5.6mM、最大取り込み速度定数 (V_{max})は45 nmol/min/mg proteinであった。従って、本発明の細胞は、濃度依存的にグルコース輸送能を示すことが確認された。

〔実施例6〕

p-糖蛋白質の輸送能

実施例2で得られた細胞TR-iBRB2が機能的なp-糖蛋白質輸送担体を持つことをp-糖蛋白質の基質である cyclosporin A (CyA)の取り込み測定を行い、p-糖蛋白質阻害剤である verapamil共存下での取り込みと比較することで検定した。24穴細胞培養用プレートに細胞TR-iBRB2を 1×10^5 /ウェル/mL培地で播種し、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。CyA の取り込み測定は以下の要領で行なった。まず、培地を吸引して除去した後に予め37℃に温めたグルコースを含む uptake buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4

10 mM D-glucose の溶液を5% CO₂-95%O₂で20分間バブリングして、NaOH で pH 7.4 に調整；以下uptake buffer ②とする）で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間ブレインキュベーションした後に uptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの [³H]CyA と 0.075 μM の非標識CyA 及び 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加えた。Verapamil 共存下での取り込みは37℃に温めた 100 μM verapamil, 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間ブレインキュベーションした後に uptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの [³H]CyA と 0.075 μM の非標識CyA, 100 μM verapamil及び 0.25% DMSO を含む uptake buffer②を 0.2 mL加えた。いずれの取り込み反応も30分間行なった。反応液を除去後、4℃の uptake buffer ②で3回洗浄した後に1mL の1N-NaOH を加えて一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。その結果p-糖蛋白質の基質である [³H]CyA の細胞／培地の取り込み比は270 μL/mg proteinであるのに対し、p-糖蛋白質の阻害剤である 100 μM のVerapamil 共存下で [³H]CyA の細胞／培地の取り込み比は 490 μL/mgとなり、約 1.8倍の有意な取り込みの増加が見られた。また、他の細胞でも同様の結果が得られた。

〔実施例7〕

スカベンジャーレセプターの機能確認

実施例2で得られた細胞TR-iBRB2が機能的なスカベンジャーレセプターを持つことを、蛍光標識体である 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate標識アセチル化LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA)の取り込みを測定することで解析した。カバーガラスに細胞TR-iBRB2を1×10⁵/ウェル/mL培地で播種し、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。Dil-Ac-LDLの取り込み測定は以下の要領で行なった。まず、培地を吸引して除去した後に予め37℃に温めた uptake buff

er②で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 10 μ g/200 μ L の Dil-Ac-LDLを含む uptake buffer②を 0.2 mL 加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4時間後に uptake buffer②を除去し、4℃の uptake buffer②で3回洗浄した。次に、3% formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャーレセプターのリガンドである 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorateで標識されたアセチル化LDL (Dil-Ac-LDL)が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞でも同様の結果が得られた。

〔実施例8〕

脈絡叢上皮細胞の分離

実施例1で得られた、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より、クリーンベンチ内で清浄に脳を摘出した。得られた脳の左右の側脳室の内側壁から第三脳室の上壁まで続く脈絡叢を採取し、PBSでよく洗浄した後、2 mLの氷冷したPBS 中で組織を1～2 mm³ に細切した。細切した組織を1 mLの10X トリプシン/EDTA 溶液（0.5% Trypsin/5.3mM EDTA; Gibco BRL 社製）に懸濁して酵素処理（37℃, 20分間）を行った。ときどき軽く攪拌することで細切した組織を分散させた。得られた細胞を培養液（10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate を含むDMEM）で洗浄した。次に、2 mLの培養液に分散して1枚の35mm ϕ 培養シャーレー（Falcon; Becton Dickinson社製）に播種し、33℃の炭酸ガス培養器（5% CO₂-95% Air, 飽和湿度）内で培養（初代培養）した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン/EDTA 液（0.05% Trypsin/0.53mM EDTA; GibcoBRL 社製）を用いておよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10²～10³

4の細胞を10²～10³の培養液に播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養し、

コロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7～10日後に上皮細胞特有の敷石状の形態を示す細胞からなるコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10cmφ培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞(TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5)を得た。

この TR-CSFB 3 を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。受託番号は FERM BP-6508 である。

〔実施例 9〕

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例 8 で得られた 5 種の細胞のラージ T 抗原蛋白質を、ウエスタンブロット法（実験医学別冊バイオマニュアル U P シリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108～115 頁，羊土社，1995 年発行）により検討した。5 種の細胞（継代数：10）を 90mmφ 培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を 1 mL の 3 % SDS-PBS (pH7.4) で可溶化した後、遠心（10,000rpm, 10 分間）して不溶画分を除去した後、ブラッドフォード法（BIO-RAD 社製プロテインアッセイキット II を使用）で総蛋白質量を定量した。それぞれ 20 μ g の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3 % スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に 1 次抗体として抗 SV40 ラージ T 抗原マウス抗体（DP02-C、CALBIOCHEM 社製）を、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体（Amersham 社製）A を反応させ、ラージ T 抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECL ウエスタンブローディング検出システム（RP N2106M1）を用いて検出した。結果を第 3 表に示す。この結果、得られた 5 種の細胞全てにおいてラージ T 抗原蛋白質を確認した。

第 3 表

細胞	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T抗原	+	+	+	+	+

〔実施例 10〕

Na⁺-K⁺ ATPaseとGLUT-1輸送担体の確認

得られた各細胞を単層培養し、細胞膜に発現されたNa⁺-K⁺ ATPase及びGLUT-1輸送担体を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。実施例8で得られた細胞TR-CSFB3を35mmφディッシュ (Falcon) のコラーゲンコートカバーガラスの上に培養した。培養液を除去し、細胞をPBS で洗浄した後、4 mLの固定液 (3% paraformaldehyde, 2% sucrose を添加したPBS)を加え室温で15分間放置後、PBS でよく洗浄した。2 mLのブロッキング液 (Block Ace; 大日本製薬社製)を加え、37℃で1時間放置してブロッキングした後、1次抗体 (抗Na⁺-K⁺ ATPase β 2 ウサギ抗体; UBI 社製、又は抗GLUT-1ウサギ抗体; Chemicon社製)を室温で1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、2次抗体 (FITCラベル抗ウサギIgG; Capel社製)を室温で1時間反応させ、PBSで4回洗浄した。最後に、ラベル化した細胞をグリセリン封入液 (90% glycerolとなるようにPBS を加えた後、Perm a Fluor (Lipshaw社製)を0.1(V/V)% 添加したもの)で封入し、マニキュアにてカバーガラスの周囲を封入した。観察は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM; Zwiss LSM 410, Zwiss社製)で行なった。この結果、第2図に示すように、細胞 TR-CSFB3 でNa⁺-K⁺ ATPase及びGLUT-1の発現を認め、特に、他の上皮細胞では側底膜側 (漿膜側) に存在するNa⁺-K⁺ ATPaseが頂側膜 (apical) 側の細胞膜

他の細胞においても同様の結果が得られた。

〔実施例 11〕

プロリン輸送機能の確認

得られた細胞のL-プロリンの輸送に対する濃度依存性を調べてL-プロリンの輸送能を求め、既報の脈絡叢におけるL-プロリンの輸送能と比較することで、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを確認した。

実施例 8 で得られた細胞 TR-CSFB3 を 24 穴細胞培養用プレートに 3×10^5 /ウェル /mL となるように播き、33°C の炭酸ガス培養器で 24 時間培養して細胞をコンフルエントにした。先ず、培地を吸引して除去した後、37°C に温めた uptake buffer ① (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO_3 の溶液を 5% CO_2 -95% O_2 で 20 分間バブリングして NaOH で pH7.4 に調整) で細胞を洗浄した。185KBq/mL の $[\text{^3H}]$ -L-proline を含む 37°C に温めた 0.2 mL の uptake buffer ① を加えた。ただし、各プロリン濃度の uptake buffer ① は、非標識体の L-プロリンで 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20mM となるように調製した。30 分間の取り込み反応を行なわせ、細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1 mL の 1% トライトン X-100 を含む 1 mL の PBS を加え、室温で一晩静置して可溶化し、液体シンチレーションカウンター (Beckmann 社製 LS-6500) を用いて放射活性を測定した。又、タンパク質量を Bio-Rad 社製 DC プロテインアッセイキットを用いて測定した。L-プロリンの濃度に対する取り込み速度のプロット式 ($V = V_{\text{max}} \times [\text{S}] / (\text{K}_m + [\text{S}])$; V_{max} は最大速度定数、 K_m はミカエリス定数、 $[\text{S}]$ は基質濃度) を用いて L-プロリンの取り込みの K_m 及び V_{max} を非線形最少二乗法プログラム MULTI (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885) を用いて解析した。結果を第 3 図に示す。この結果、L-プロリン ($[\text{^3H}]$ -L-proline) の取り込みは濃度依存的であり、その K_m 値は 1.5 mM、 V_{max} 値は 2.4 nmol/min/mg protein であった。求めた K_m 値は、家兔

脈絡叢での報告された値の1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82) と近似した。このことから、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

[実施例 1 2]

コリン、ウアバインによるプロリン能動輸送の阻害

単離脈絡叢におけるL-プロリンの取り込みは Na^+ 依存性であることから、得られた細胞におけるL-プロリンの取り込みの Na^+ 依存性を確認して、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを、実施例 1 1と同様の方法により確認した。ただし Na^+ -free 条件下でおこなうためuptake buffer ①の組成中の Na^+ をすべてcolineに置換したものをを用いた。又、ウアバインの効果を調べる（ウアバインは Na^+ - K^+ ATPaseの阻害剤であるため、 Na^+ の濃度勾配が消失する）場合には、1mM ウアバインを添加したトレーサーを含む uptake buffer①を使用した。いずれも30分間の反応を行なった。結果を第4図に示す。 Na^+ -free 条件下ではL-プロリンの取り込みが98%阻害された。又、1mMウアバインによりL-プロリンの取り込みが56%の阻害された。この結果から、細胞TR-CSFB3におけるL-プロリンの取り込みは Na^+ 依存性であることが示された。このことから、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

[実施例 1 3]

脳毛細血管内皮細胞の分離

ラット脳からの毛細血管内皮細胞の分離は実施例 2 に示した方法に準じて次の手順で行なった。実施例 1 で得たSV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より大脳を摘出した。

クリーンベンチ内で摘出した大脳を氷冷した調製用緩衝液（10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin sulfate, 0.5% ウ

1 mL用テーパー型テフロン製ホモゲナイザー (WHEATON 社製) に移し、1 mLの氷冷した調製用緩衝液を加え、4回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。得られたペレットを1 mLの酵素溶液 (0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μ g/mL tosyl-lysine-chloromethylketone を添加したHBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37℃, 30分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。得られたペレットから不要な組織を除去するため、10 mL の16%デキストランを含むHBSSにペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15分間, 4℃) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び1 mLの酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37℃, 30分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。次に、得られたペレットを2 mLの培養液 (15 μ g/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 2.50 μ g/mL amphotericin Bを添加したDMEM) に分散して1枚のcollagen type I をコートした 35 mm ϕ 培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に播種した。33℃の炭酸ガス培養器 (5% CO₂- 95% Air, 飽和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA; Gibco BRL社製) を用いて細胞を剥離し、細胞を分散播種した。継代はおおよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10² ~10³ 個の細胞を collagen type Iをコートした100 mm ϕ 培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に播種した。33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7~10日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10

0 mmφ培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株 (TR-BBB1 TR-BBB5 TR-BBB6 TR-BBB11 TR-BBB13) を得た。これらの細胞株は内皮細胞特異的なスピンドルファイバー状の形態を示した。

[実施例14]

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例13で得られた5種の細胞株におけるラージT抗原蛋白質の発現をウェスタンブロット法 (実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコル」 108~115 頁, 羊土社, 1995年発行) により検討した。5種の細胞株 (継代数: 20) を90mmφ培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を3% SDS-PBS (pH7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000 rpm, 10分間) して不溶画分を除去した後、ブラッドフォード法 (BIO-RAD 社製プロテイン assay II を使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ20 μgの蛋白質をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原抗体 (CALBIOCH EM社製, DP02-C) を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製) を反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECL ウェスタンブロットング検出システム (RPN2106M1) を用いて検出した。5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

第 4 表

細胞	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
----	---------	---------	---------	----------	----------

T抗原 + + + + +

〔実施例 15〕

細胞の同定

実施例 13 で得られた細胞株が脳毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体およびp-糖蛋白質の発現をウエスタンブローディング法で検定した。得られた各細胞株について、実施例 14 と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗マウスGLUT-1抗体（Chemicon社製，Temecular, CA）又は抗p-糖蛋白質ウサギ抗体（抗mdr抗体、Oncogene Research Products社製）を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham社製）又はHRP標識抗ウサギIgG抗体（Cappel社製）を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいはp-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECL ウエスタンブローディング検出システム（RPN2106M1）を用いて検出した。5種の細胞株全てにおいてGLUT-1蛋白質及びp-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞が脳毛細血管内皮細胞であることが同定された。

第 5 表

細胞	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
GLUT-1	+	+	+	+	+
p-糖蛋白質	+	+	+	+	+

〔実施例 16〕

グルコース輸送能の確認

実施例 13 で得られた細胞株 TR-BBB1, TR-BBB5, TR-BBB6, TR-BBB11, TR-BBB

13が機能的なGLUT-1輸送担体を持つことを先に記載した実施例5の方法より3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) 取り込み測定を行い、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで確認した。GLUT-1の基質である $[^3\text{H}]3\text{-OMG}$ の取り込みは濃度依存的であり、その初期取り込み速度を7.07-10.2 $\mu\text{l/min/mg protein}$ であった。

第 6 表

細 胞	取り込み初速度 ($\mu\text{l/min/mg protein}$)		
TR-BBB1	8.12	±	0.62
TR-BBB5	10.1	±	1.32
TR-BBB6	7.07	±	0.92
TR-BBB11	10.2	±	0.62
TR-BBB13	8.96	±	0.50

〔実施例17〕

スカベンジャーレセプター機能の確認

実施例13で得られた細胞株TR-BBB13が機能的なスカベンジャーレセプターを持つことを、蛍光標識体である 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indo carbocyanine perchlorate標識アセチル化 LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) の取り込みを測定することで解析した。実施例7に示した方法に準じて行なった。カバーグラスに細胞株TR-BBB13を 1×10^5 /ウェル/mL培地で播種し、33°Cの炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。Dil-Ac-LDLの取り込み測定は、先ず、培地を吸引して除去した後に予め37°Cに温めた uptake buffer② (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4mM CaCl_2 , 1.4

e. の溶液を5%CO₂-95%O₂ で20分間バブリングして、NaOHで pH7.4に調整) で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 10 μg/200 μL のDil-Ac-LDLを含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4 時間後に uptake buffer②を除去し、4℃の uptake buffer②で3回洗浄した。次に、3% formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャーレセプターのリガンドである1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate で標識されたアセチル化 LDL(Dil-Ac-LDL)が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞株でも同様の結果が得た。

〔実施例18〕

アルカリフォスファターゼ及びγグルタミルランスペプチダーゼ活性の確認

実施例13で得られた細胞株が脳毛細血管内皮細胞に発現しているアルカリフォスファターゼ活性及びγグルタミルトランスペプチダーゼ活性を発現することを常法に従い測定した。測定には、アルカリ性ホスファターゼテストワコー及びγ-GTP- テストワコー (和光純薬社製) を使用し、それぞれのキットに記載された標準測定法に従って測定した。尚、タンパク質量は、ブラッドフォード法 (プロテインアッセイキットII; BIO-RAD社製) により測定した。

アルカリフォスファターゼ活性及びγグルタミルトランスペプチダーゼ活性はラット脳毛細血管リッチ画分(Brain Capillaries) を対照に、それぞれ 8.7-25.8%及び 5.4-22.6%を示し、脳毛細血管内皮細胞特異酵素の発現を認めた。

第 7 表

細胞	アルカリフォスファターゼ活性	γグルタミルトランスペプチダーゼ 活性
	μU/mg protein (対照比%)	μU/mg protein (対照比%)
TR-BBB1	23.7 ± 7.17 (25.8%)	3.62 ± 0.47 (12.4%)

TR-BBB5	11.9	± 2.92 (13.0%)	2.05	± 0.76 (7.0%)
TR-BBB6	22.3	± 8.78 (24.3%)	1.58	± 0.52 (5.4%)
TR-BBB11	8.05	± 2.37 (8.7%)	6.60	± 0.93 (22.6%)
TR-BBB13	13.7	± 3.92 (14.9%)	5.60	± 1.08 (19.1%)
対照 (Brain Capillaries)	91.8	± 30.8 (100%)	29.2	± 11.8 (100%)

産業上の利用の可能性

本発明により、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞が提供される。また、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、(シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため) 網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持や網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

さらに本発明により、脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT

層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞が提供される。また、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理することを特徴とする、不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究等に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝あるいは恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明により、脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞株が提供される。さらにまた、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脳組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、シャーレー上で培養すると脳毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、血液脳関門を試験管内で再構築することができ、脳毛細血管中の血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

寄託された微生物への言及

1. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称 ; 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名 ; 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-3566)

ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成 10 年 (1998) 年 9 月 18 日

ハ. 寄託機関の寄託について付した受託番号

FERM BP-6507

2. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称 ; 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名 ; 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-3566)

ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成 10 年 (1998) 年 9 月 18 日

ハ. 寄託機関の寄託について付した受託番号

FERM BP-6508

3. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称 : 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名 : 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-3566)

ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成 11 年 (1999) 年 9 月 22 日

ハ. 寄託機関の寄託について付した寄託番号

FERM BP-6873

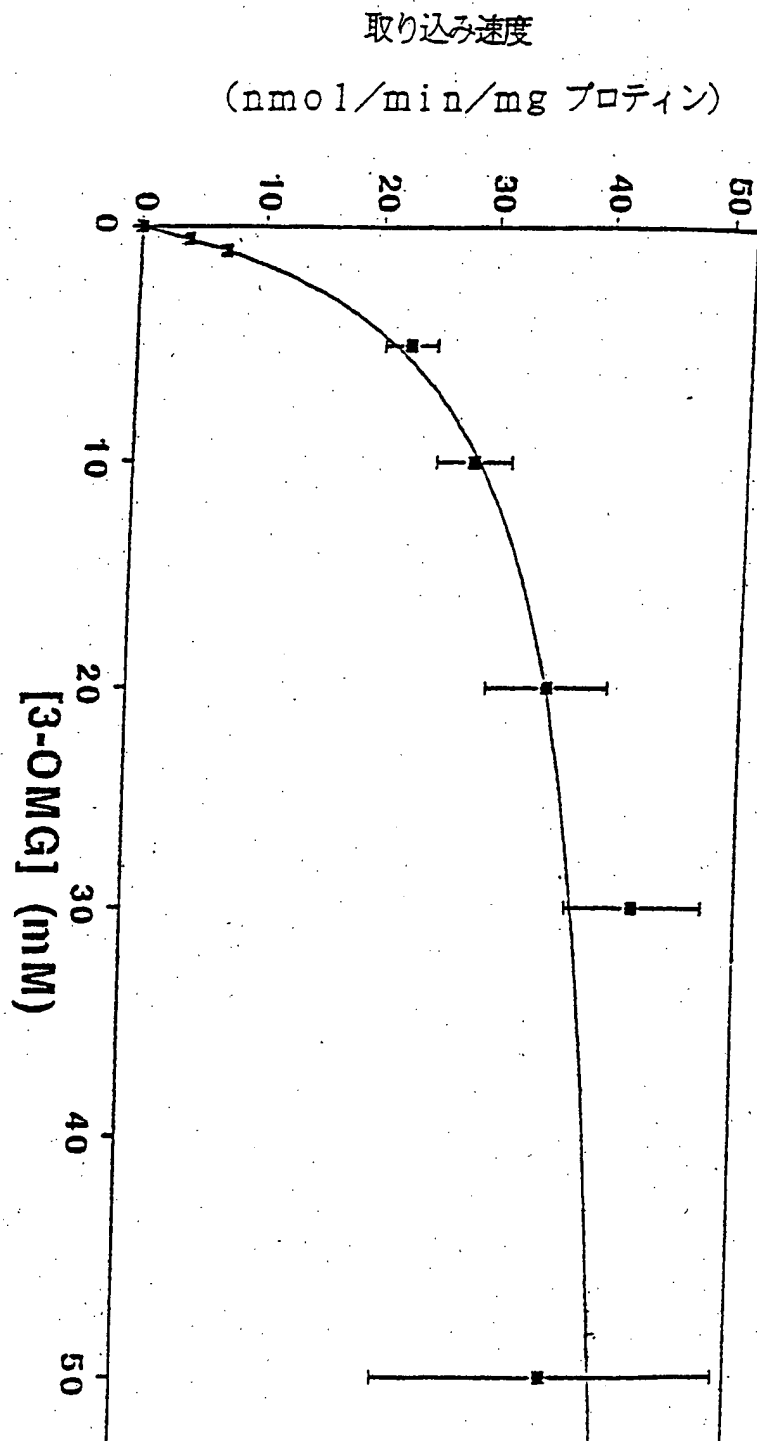
請 求 の 範 囲

1. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞。
2. トランスジェニック動物がラットである、請求項1記載の樹立された不死化細胞。
3. 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。
4. 受託番号がFERM BP-6507である、請求項3記載の樹立細胞。
5. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する不死化細胞の樹立方法。
6. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。
7. 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞。
8. 受託番号がFERM BP-6508である、請求項7記載の樹立細胞。
9. (受託番号が)SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在

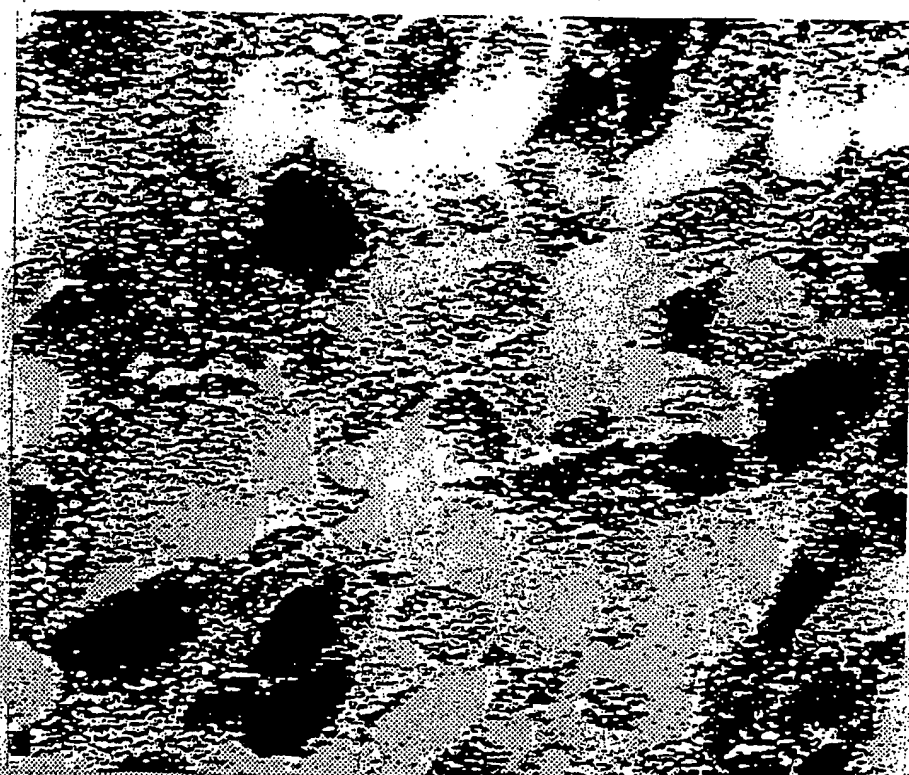
し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する、不死化細胞の樹立方法。

10. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞。
11. 脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT 抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリフォスファターゼ、及びγ-グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞。
12. 受託番号がFERM BP-6873である、請求項11記載の樹立細胞。
13. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT 抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞株を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリフォスファターゼ、及びγ-グルタミルトランスフェラーゼを発現する不死化細胞の樹立方法。
14. SV40温度感受性突然変異株 tsA58 のラージT 抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞株を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT 抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリフォスファターゼ、及びγ-グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞。

第1図

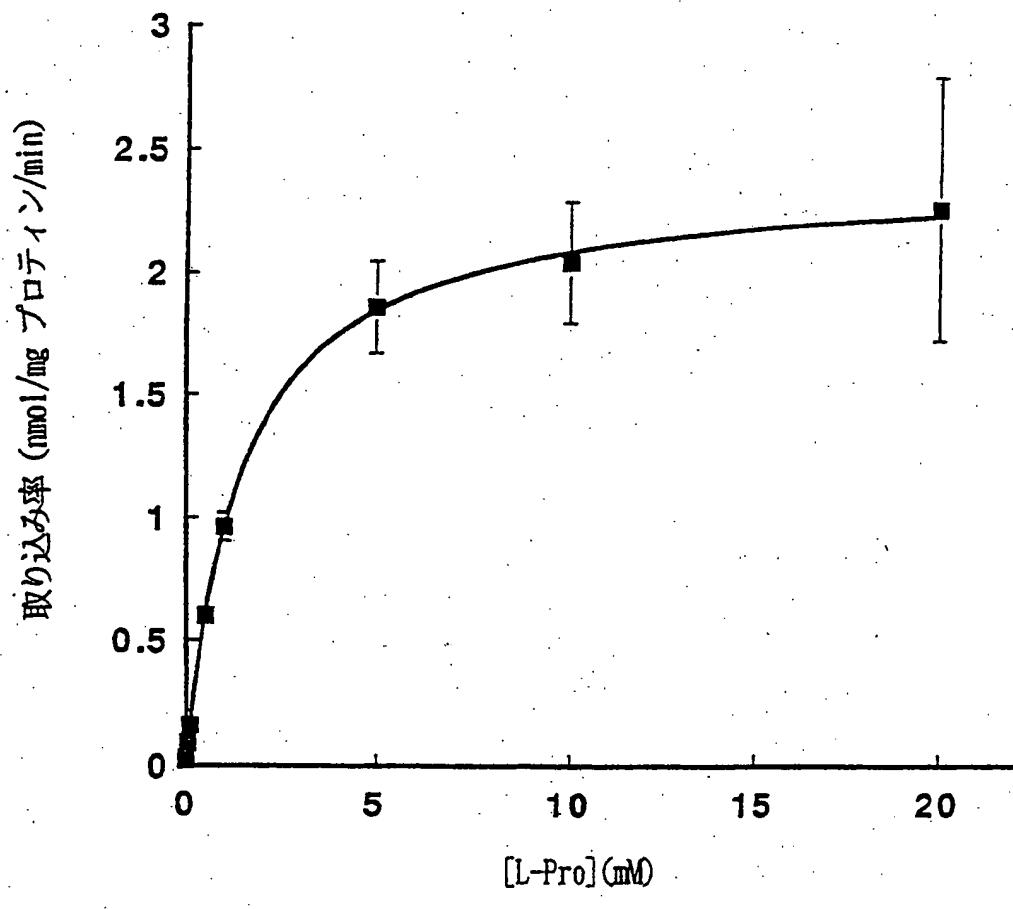


第2図

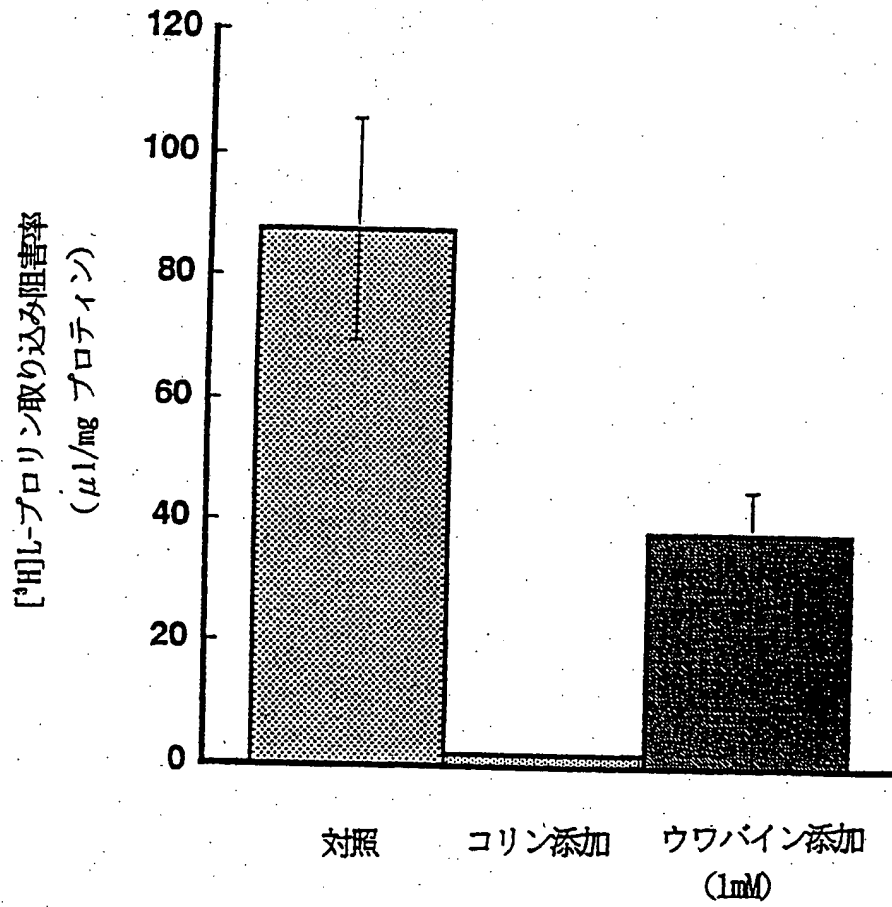


←頂側膜(apical)側
←側底膜(漿膜)側

第3図



第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAKVOORT, A. et al., "The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium", Journal of Neurochemistry (Sept.1998), Vol. 71, No. 3, pages 1141-1150	7-10
Y	Takashi Tsuruo, "Molecular structure and physiological system of the resistance of anticancer drug - Effects on blood-brain barrier", Pharmacology magazine (1995), Vol. 115, No. 7, pages 513-522	11-14
Y	HOHEISEL, D. et al., "Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system", Biochemical and Biophysical Research Communications (March, 1998), Vol. 244, No. 1, pages 312-316	11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,
A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,
A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NOBLE, M. et al., "The H-2KbtsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines", Transgenic Research (1995), Vol. 4, No. 4, pages 215-225	1, 2 3-14
Y	Kazuhisa Hayakawa et al., "The cultured capillary endothelial cells derived from bovine retinas - the change in forms by adding glucose-", New Ophthalmology (1988), Vol. 5, No. 6, pages 931-936	3-6
Y	GILLIES, M. C. et al., "Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro", Investigative Ophthalmology & Visual Science (1997) Vol. 38, No. 3, pages 635-642	3-6
Y	RAMANATHAN, V. K. et al., "Primary cell culture of the rabbit choroid plexus: an experimental system to investigate membrane transport", Pharmaceutical Research (1996), Vol. 13, No. 6, pages 952-956	7-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 December, 1999 (20.12.99)

Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,
A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,
A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	NOBLE, M. et al. "The H-2K ^b tsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines", Transgenic Research (1995) Vol. 4, No. 4, p. 215-225	1, 2 3-14
Y	早川 和久 他 "ウシ網膜由来培養血管内皮細胞-糖負荷による形態の変化-", あたらしい眼科 (1988) 第5巻, 第6号, p. 931-936	3-6
Y	GILLIES, M. C. et al. "Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro", Investigative Ophthalmology & Visual Science (1997) Vol. 38, No. 3, p. 635-642	3-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.12.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	RAMANATHAN, V.K. et al. "Primary cell culture of the rabbit choroid plexus: an experimental system to investigate membrane transport", Pharmaceutical Research (1996) Vol.13, No.6, p.952-956	7-10
Y	HAKVOORT, A. et al. "The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium", Journal of Neurochemistry (Sept.1998) Vol.71, No.3, p.1141-1150	7-10
Y	鶴尾 隆 "抗がん剤耐性の分子機構と生理機構 -血液脳関門への関与", 薬学雑誌 (1995) 第115巻, 第7号, p.513-522	11-14
Y	HOHEISEL, D. et al. "Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system", Biochemical and Biophysical Research Communications (March, 1998) Vol.244, No.1, p.312-316	11-14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.